

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ET

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER I

RÉPONSES MICROÉVOLUTIVES ET COÛTS ADAPTATIFS DE  
POPULATIONS DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* EXPOSÉES À DES STRESS  
ENVIRONNEMENTAUX

THÈSE

PRÉSENTÉE EN COTUTELLE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

MORGAN DUTILLEUL

JANVIER 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier l'IRSN, et en particulier le SECRE (maintenant SERIS), dirigé par Jacqueline Garnier Laplace, qui a accepté de financer mon doctorant et m'a permis de réaliser toutes les expériences que j'ai souhaité entreprendre. Merci de m'avoir offert la possibilité d'aller à différents congrès scientifiques nationaux et internationaux, d'entreprendre une cotutelle avec Montréal et surtout de nous avoir laissé, à mes encadrants et moi, la possibilité de mener ce travail avec énormément de liberté.

Jean-Marc, je te remercie pour ton soutien, ton optimisme, tes encouragements et compliments réconfortants, pour ta bonne humeur, ta confiance et pour m'avoir laissé l'autonomie dont j'avais besoin afin de m'épanouir totalement dans ce projet. Merci pour toutes ces photos qui me permettront de ne jamais oublier ma thèse, je serai toujours heureux de les revoir. Mais surtout pour cette belle idée de projet qui ne demandait qu'à être développée, pour tes nombreux conseils en écotox, et pas seulement, sur les expériences, la rédaction, pour l'idée de la cotutelle et aussi parce que ta porte était toujours grande ouverte pour mes interrogations. Je te remercie très sincèrement.

La superbe ambiance qui règne entre les étudiants du labo Réale est, à n'en pas douter, permise par ta joie de vivre, de partager, par ta justesse et par ce merveilleux sentiment d'être ton égal que tu nous permets d'avoir. Bien sûr, cela jusqu'à ce que tu lâches une idée sur l'un de nos projets, et nous pensons tous: « Il est vraiment fort ! ». Je te remercie tout particulièrement Denis pour la manière dont tu m'as laissé m'approprier ce projet d'évolution tout en me suggérant toujours la bonne idée au bon moment, que ce soit sur mes expériences, analyses, présentations ou articles. Merci de ne pas savoir dire non car je n'aurai pas eu la chance de t'avoir en tant que directeur ! Si je retire de la fierté de ce travail, c'est grâce à toi.

Merci Simon pour ton enthousiasme sans faille sur mon projet, tous tes bons conseils et suggestions ainsi que tes connaissances illimitées sur ces chers nématodes, la communauté scientifique qui travaille avec eux et toutes les méthodes pour les étudier. J'aurai perdu énormément de temps lors des expériences sans ton aide précieuse dans la prise en main de ces petits vers.

Je tiens à remercier Anne Charmantier et Luc DeMeester (« Bedankt Luc ») de prendre le temps d'évaluer ma thèse en tant que rapporteurs ainsi que Pedro Peres-Neto et Estelle Jumas-Bilak qui ont accepté de faire partie de mon jury, malgré leur emploi du temps de chercheur (« i.e. » extrêmement chargé).

J'adresse aussi des remerciements à Henrique Teotónio pour tous ses bons conseils et sa population de nématodes qu'il m'a gracieusement envoyée et avec laquelle j'ai réalisé la quasi-totalité de mes expériences ; Sandrine Pereira pour son aide au laboratoire et sa suggestion d'utiliser le tampon HEPES dans mes expériences, cela m'a fait gagner beaucoup de temps ! ; Laurie Lemaire que j'ai formée au laboratoire et qui a participé à la réussite de ma première expérience ; Laurent Garcia-Sanchez, Emmanuel Milot, Cristian Pasquaretta, Pedro Peres-Neto pour vos conseils et coups de pouce en statistiques ; Catherine Lecomte et Benoit Goussen pour votre grande aide au laboratoire ; Virginie Camilleri pour les analyses métrologiques ; Simon Descamps pour ton aide dans la prise en main des nématodes ; Fabrice Daian pour ton logiciel de mesure automatique ; Caroline Grou pour toutes tes corrections linguistiques ; et tous ceux qui ont relu des parties de mon manuscrit de thèse.

Je souhaite également remercier à Montréal, Ginette Lozeau et Chantal Gagné pour le support administratif très conséquent des doctorants de l'UQAM, ainsi que François Dragon, Denis Archambault,



Pierre Drapeau, Alison Derry, Faïnnie Pelletier pour votre temps lors de mes examens. De même, à l'école doctorale CBS2 de Montpellier, je remercie Catherine Larose et Sandrine Urvoy ainsi que Christian Le Peuch pour leur aide à comprendre comment gérer certains problèmes administratifs. Je remercie également les différents chercheurs qui m'ont conseillé en particulier durant les premières étapes de mon doctorat : Mathias Gauduchon (j'aurai aimé avoir le temps de développer ce projet de modélisation avec toi), Rémy Beaudouin, Georges Stora, Jonathan Verreault, Pedro Peres-Neto.

Merci aux membres du labo de l'IRSN pour les moments partagés, de détente, de travail et vos conseils : Arnaud, Béatrice, Daniel, Isabelle, Jean-François, John, Julien, Karine, Laureline, Laurent, Nadine, Nicolas D., Olivier H., Olivier S., Pascale, Pierre, Sandrine F., Sylvie, Virginie. Je souhaite adresser une pensée particulière à : Rodolphe et Christelle vous avez été chacun à votre tour très compréhensifs, aidants et vraiment agréables. C'était un vrai plaisir de vous avoir en tant que chefs de labo. Fred A., sans toi je n'aurai jamais été en thèse à l'IRSN, merci encore pour ce super stage de M2. Fred C. et Nico T., pour un super moment à Montréal qui m'a permis de mieux vous découvrir. Il faudra qu'on le fasse un jour ce poker ! Magali, merci pour toutes nos petites discussions, j'aurai aimé pouvoir prendre un peu plus le temps encore. Cathy, pour ton soutien, ta gentillesse, ta bonne humeur, pour tes nombreux conseils et enfin pour toutes nos pauses improvisées, courtes et moins courtes, je ne t'oublierai pas. Claudine, sans toi je me serai arraché beaucoup plus de cheveux ; c'est très chaleureusement que je te remercie pour tout l'aide administrative que tu m'as apporté, toutes tes attentions, ta bonne humeur malgré le nombre de personnes à satisfaire et pour tous ces bonbons !!! Je pense également à Valérie, Magali et Stéphanie, merci pour les pauses du matin et vos messages quand j'étais loin. Et je n'oublie pas non plus le CE de l'IRSN (merci Sylvie), qui grâce à ce super avantage, m'a permis de garder aujourd'hui de superbes souvenirs de la Namibie et du Cambodge !

Le « groupe des jeunes » de l'IRSN : Delphine, Adrien, Adeline, Nico T., Guillaume, Simona, Kewin, Antoine L., Audrey pour tous ces déjeuners, ces pauses à parler de tout, de rien et surtout de bons délire. Antoine T., merci pour ces trois années de thèse que nous avons passée ensemble, et en grande partie en tant que coloc (La Coloc !), pour toutes ces soirées complètement déjantées à danser dans le salon (parfois juste à deux^^) et pour ton aide à relativiser pendant certaines périodes. J'espère te revoir très vite à la Boubouuuu ! Starrlight, la personne la plus passionnée par la recherche que je connaisse, je t'admire pour ça. Merci pour ces fous-rires au labo, en congrès et dans le bus de 18h30. Nicó L., ça fait déjà un moment que tu as fini mais tu m'as tellement fait rire pendant la première année, même si je les comprenais déjà, désormais je sais ce que tu ressentais à la fin de thèse^^. Benoit pour nos manip communes (c'était un plaisir de compter toutes ces larves avec toi !), le bureau partagé, et surtout pour m'avoir écouté me plaindre sans jamais m'envoyer bouler, pour ton calme, ta patience et ton humour bien à toi, merci. Florian (« pour toi mon Loulou ! ») et Iris (« bien ou bien ? »), je vous ai découvert très récemment mais merci d'avoir été capable de me faire mourir de rire au moins une fois par jour, alors que j'étais en toute fin de doc.

A tous les étudiants et post-doc de l'UQAM avec qui j'ai passé cette dernière année. Je vous remercie tous pour les bons moments dans notre « labo-couloir » (où nous avons été jusqu'à huit), les pauses déjeuners dans le GRECA et toutes les bières du vendredi. Je recommande, au passage, à tout amateur de bière de venir découvrir le savoir-faire québécois (et c'est un gars qui a grandi près de la frontière belge qui le dit^^). Les bières du vendredi à partir de 16h30... enfin 16h... enfin 15... non on n'y a jamais été si tôt ;-). C'était vraiment le fun, j'capote ! J'ai tellement de bons souvenirs et d'anecdotes, comme la recherche « intensive » des ratons pour ma dernière soirée à Montréal, pour finalement les trouver sur le parking, dans les poubelles... Ou le soir de l'Ananas ;-). Je vous remercie Cate, François, Renato, Sophie, Mewen, Mohammad, Marie-Pierre, Anik, Annie, Florent, Raphael pour tous les bons moments. Et plus particulièrement : Caro, merci pour ta chill out attitude qui doit venir de l'Ontario (nan j'te niaise), pour les visites et découvertes à Montréal ou ailleurs au Québec, ton amour des

écureuils ;-)) et surtout ton grand cœur. Charline, merci pour nos milliers de discussions, nos échanges de répliques de Kaa, tes attentions et ton soutien, et avec Max, merci à vous deux pour tous les bons délires et la découverte de votre passion. Faudra me redire le nom des oiseaux à la démarche de Jackson, car je ne veux pas être victime des colibris et surtout être considéré en tant que tel ! Merci à Cristian, best italian guy ever, I love your way of thinking, your positive energy and your victory dance in the lab or in the students parties (« Do...Do...Domorrow »). Simone, je te remercie pour tous ces bons moments : prendre un rāmen, jouer à Rainbow Six, voir Thierry Henry marquer contre l'Impact, et tellement d'autres choses ! Merci Simo. PO, j'ai adoré te découvrir pour ta passion dans le travail, la culture en général, le sport, les objets farfelus et bien sûr la bière ! Et surtout pour tes magnifiques répliques comme « on ne french les poneys cute ! ». Leila merci pour ta philosophie de vie, pour tes attentions, les découvertes de Montréal et de cultures que je ne connaissais pas. J'espère pouvoir te retrouver un jour dans une autre région du monde ! Laurent, l'homme le plus doux du monde mais aussi un mec super et super intéressant. Gab, merci pour ta bonne humeur qui m'a mis à l'aise dès mon arrivée dans le labo. Lucia, gracias por tus sonrisas, tus bromas y tu amabilidad (Pollos Hermanos !) ; Juan, merci pour les discussions franco-anglo-espagnoles, Espero que un día podré comer un asado a su casa. ; Manu, merci pour la découverte des « Air-lous » et d'autres bons moments comme dans le McDo d'Ottawa ! Je vous remercie tous aussi pour vos conseils que ce soit sur mes analyses ou mes présentations.

J'ai aussi une pensée toute particulière pour mes chers nématodes, mes *C. elegans*. Et oui... On peut même s'attacher à des vers ! Sans inclure de nombreux tests supplémentaires qui n'ont pas été concluant, vous êtes 462972 nématodes à avoir servi à mes expériences (j'ai donc appuyé au moins autant de fois sur le compteur !!!). Sans vous, rien n'aurait été possible ! Je n'oublierai pas non plus mes compagnons d'infortune lors des longs et pénibles moments de rédaction : les claviers, souris, écrans et chaises de bureau ; je pense qu'il est temps pour moi de vous laisser un peu de côté !

Et pour toutes les personnes qui n'étaient justement pas liées à ma recherche mais sans qui je n'aurais jamais pu venir à bout de mon doctorat, je tiens également à les remercier très sincèrement :

Malgré tout ce qui a pu se passer, je ne peux pas ne pas avoir une sincère pensée positive pour Pamela qui a, entre autres, tout quitté pour me suivre à Montréal, merci d'avoir essayé...

Merci à Monique, Mélanie, Catherine, Yannick, Vanessa, Houda, Fred, Cathy, Magali, Merryll, Agate et bien d'autres avec qui j'ai passé des moments de décompression énorme à danser la salsa cubaine ! Vous n'imaginez pas à quel point vous m'avez permis d'aller au bout de ces trois années de travail. Un énorme merci à vous tous pour ce grand sourire que vous me donnez si souvent ! Je ne peux m'empêcher d'ajouter un mot particulier pour Jo et Tiffanie, pour toutes vos phrases qui m'ont touché, merci Jo pour le plaisir que tu prends à danser, à partager et surtout que tu communique aux autres ! J'essayerai de ne jamais oublier ta philosophie.

Pêle-mêle : A Crevette (merci de m'avoir parlé de l'océano à Marseille !), Tizote, Julie (génial ces retrouvailles au Québec !), Paul, Damien, Cindy, Antoine et tous les autres potes de Gwada qui m'ont permis avant la thèse de tenir le coup et de passer en master 2, j'espère vous revoir ! Merci aussi à la famille Gouillon et « extensions » qui a toujours été si agréable avec moi, merci pour votre accueil ; Fabrice, merci pour tous tes messages et ton soutien. Mathieu, je te remercie pour la découverte de tous ces mangas et jeux, ton soutien et ce personnage que tu es et que j'aime beaucoup (encore plus quand tu fais le « gars qui marche »). J'espère un jour voir ton « code » mon physicien fou ^^.

Un autre soutien de chaque instant, dans toutes sortes de moments, les heures et les heures (et les heures...) de manip ou d'analyses, les moments de stress, de blues, de grand bonheur et de « craquage » négatif et positif, pour ne citer que quelques artistes : merci à Nujabes, The Offspring, The Coors, C2C,

Tryo, Blink-182, Matisyahu, Akon (et j'assume !), Coldplay, Calle Real, Beirut, Yann Tiersen, La Rue Kétanou et bien d'autres...

Maintenant et pour finir (je sais, c'est long !) je voudrais faire une section particulière pour vous. Ceux sans qui je n'aurai jamais eu la force de traverser les moments difficiles pendant ces trois dernières années et même bien avant ça. Vous êtes un tout pour moi... Même si, pour la plupart, je vis loin de vous depuis quelques années, je ne peux pas me passer de vous ! Vous êtes ce que j'ai de plus cher au monde.

Brandon, mon petit frère qui a tellement grandi et mûri, j'en apprendrais tout le temps à tes côtés et te voir t'épanouir autant dans ce que tu fais me fascine. Tu es totalement tourné vers les autres, et ça me rend très fier de toi. Tu es la personne qui est capable de me donner les plus grands fous rires au monde et je t'en remercie énormément ! Même si parfois elles me rendent dingues, je ne pourrai pas me passer de tes trouvailles linguistiques (« Beufed » en tête !) et tes crises frénétiques de chant^^. Merci p'tit frère.

Gill, Gan-Guilz, le phénomène totalement dingue (« ce mec est fou ! ») mais tellement génial que j'ai rencontré entre deux Giants « dans le biiin ! ». Merci pour ton soutien surtout dans les derniers moments, les plus difficiles. Tous tes appels et surtout tes milliers de SMS m'ont fait énormément de bien durant ces derniers mois ! Maintenant, j'attends avec impatience notre prochaine « ssemou », un bon PFK roubaisien, kiffer te rendre fou sur du zouk love et toi me rendre la pareille avec une session orale d'outre-Rhin ;-)

Guillaume (Wilhelm ou William), on se connaît déjà depuis plus de la moitié de nos vies. On en a traversé des moments futiles mais aussi beaucoup moins futiles ensemble. Nous avons assez de souvenirs partagés pour une vie mais j'espère en avoir encore pour les milles prochaines. C'est toujours si bon de t'avoir au téléphone (merci de m'avoir aidé à relativiser plus d'une fois) et surtout de rentrer pour passer une soirée à la maison mère (« Lamahadéoutsh vaincra ») ! On va enfin pouvoir organiser la « soirée Escaflowne » et se faire un petit festoche ! :) :p ;) Et Emilie, fais attention à lui, mais je ne me fais pas de souci, t'es quelqu'un de vraiment génial !

Iridia, la jolie petite mexicaine toujours prête à faire la fête ! Merci de m'avoir donné, la première, un aperçu de la bonne humeur et de l'ambiance latina, c'est sûrement toi qui m'as donné envie de danser la salsa !!! Alors merci beaucoup, et n'oublie jamais « la moto que me gusta wey » !

Jeremy, Djay, mon grand frère, je suis extrêmement heureux de la relation que nous avons construite si naturellement depuis mon arrivée à Marseille. Tu fais toujours attention à moi et tu arrives toujours à me rendre le sourire, j'ai sacrément « touché au flop » en t'ayant prêt de moi pour la thèse ! Et toi aussi Stéphanie, pour nos délires, tes mots réconfortants et ton rire. Je vous remercie beaucoup de m'avoir accueilli quand je suis arrivé dans le sud et tant de fois encore après. Je suis tellement fier d'être devenu le parrain de votre sublime petite Clémence aux yeux magnifiques...

Ma Pauline, Pooh, même si nous ne nous étions jamais vraiment perdu de vue, je suis heureux d'être si proche de toi aujourd'hui. Je n'imaginai pas qu'on puisse soutenir quelqu'un à ce point, surtout en étant sur différents continents. Maintenant je le sais puisque tu l'as fait pour moi, et je ne l'oublierai, vraiment, jamais... Fais-moi un de ces sons dont toi seule a le secret, rejoins-moi vite sur la piste pour un merengue endiablé, et à très vite pour un petit jédoné ou une tasse de thé, avec Caridou bien sûr !

Philippe, mon Fafay, avec qui j'ai eu la chance de vivre pendant plus de la moitié de mon doctorat (et qui a même tapé le point final de ma thèse). On devrait finir par sortir une compilation de nos plus grands titres créés en voiture sur nos « virages à gauche ». T'es une personne en or et ce n'est pas que « selon moi ». Non je n'ai pas écrit ce message sous la contrainte mais parce que j'en avais envie ^^ . On en aura passé du temps ensemble, je ne remercierai jamais assez ta boîte de t'avoir engagé dans le sud !

Merci pour ton grand soutien et tes bons repas quand j'étais totalement débordé. « Tu es joli, c'est vrai... » mais maintenant « chuuut » et prête-moi ton hélico !

Quentin, ou Qwentine en République Tchèque, mi-Beatles mi-Cambodgien, même si ce n'est pas exactement ce que tu fais, tu resteras toujours le grand ingénieur en four solaire pour moi... Merci pour ce merveilleux moment que tu nous as fait vivre au Cambodge ! C'était un pur moment de bonheur avant mon départ pour le grand froid. A bientôt en Amérique latine ou ailleurs dans le monde ! Si tu viens, promis je te filerai « un croc » ;-)

Rémi, « Oh ta C....le ! », le Lourdel au grand cœur, c'est dingue ce que deux gars peuvent se dire, et « c'est ça qui est bon ! ». Merci de toujours trouver les mots quand je ne vais pas fort ou même quand tout va bien, par mail, téléphone et quand c'est possible avec un petit match de foot, sur un terrain ou le plus souvent sur la PS3<sup>^^</sup>. On va continuer à en profiter un maximum maintenant, à commencer par se baigner dans la mer du Nord en hiver ! Et surtout... Surtout, n'oublions jamais les événements qui se sont déroulés sur la plage de Pompierre !!! ;-)

Stéphanie, merci pour toutes tes petites attentions et tes sourires bienveillants. Je suis très heureux que tu sois venue à Montréal, ça nous a permis de nous retrouver encore un peu plus. Bon, il est temps que je vous vois, toi et Damien, en compétition de brass band, je suis sûr que tu vas le battre ! ;-)

Mes sœurs Bérangère et Fanny et ma nièce Lou, que je vois malheureusement trop peu mais a qui je pense aussi très souvent. Je vous embrasse fort et je compte bien prendre un peu plus le temps pour vous voir désormais !

Mes grands-parents, j'aurai tant aimé que vous soyez encore là pour partager avec moi ce moment où je soumettrai ma thèse. Et papy, une dernière fois, j'aimerais t'entendre me demander quand est-ce que j'allais enfin arrêter les études pour le travail, tenter de t'expliquer le principe d'un doctorat qui ne me permet pas de soigner les gens et surtout boire un dernier verre avec toi... Ce qui est sûr c'est que vous étiez fantastiques !

Merci aussi à tout le reste de ma famille de toujours me rappeler, par leur joie de vivre, qu'il n'y a rien de plus important que de passer des bons moments avec eux autour d'un bon repas, surtout s'il est préparé par tata Elia !

Papa, je te remercie pour ta confiance, ton soutien, ta fierté et ton esprit de déconne sans faille, merci de m'avoir transmis ton amour de la musique, de la danse et ton sens de la fête. J'adore cette folie très positive que tu as, et que je retrouve également chez mes frères, tes fils. Tant de chose qui m'ont servi à aller au bout de l'écriture de cette thèse. On va avoir le temps de s'écouter un petit Eddy Mitchell maintenant !

Maman, pour tes sacrifices, ton aide toujours poussée à l'extrême, ta façon de m'écouter déblatérer tous mes problèmes sans jamais broncher et ton courage. Tu supportes à toi seule la quasi-totalité de mes sauts d'humeur parfois très durs... C'est donc grâce à toi que la plupart des gens me pensent « trop gentil ». Je te remercie Maman. Je vais tout faire pour être plus cool désormais :-)

Merci aussi de toujours me rappeler, par ta façon d'agir, que la famille, au sens large, reste ce qu'il y a d'essentiel à la vie.

Je ne saurai vous dire à quel point je vous remercie en particulier d'avoir été là dans ce moment difficile qui est intervenu en même temps que la dernière et longue ligne droite de rédaction... Vous avez réussi à trouver les mots même si vous étiez loin et ça m'a permis de ne pas lâcher. Je vous aime.

Merci à vous tous ainsi qu'à ceux que j'ai pu oublier de citer, pour chaque chose que vous avez pu entreprendre, même pendant un instant, pour m'aider dans mon travail, me soutenir, me réconforter ou me faire rire.

Et maintenant, bonne lecture à tous !



## TABLES DES MATIÈRES

|   |       |
|---|-------|
| LISTE DES FIGURES .....   | xiv   |
| LISTE DES TABLEAUX .....  | xvi   |
| RÉSUMÉ .....  | xviii |
| ABSTRACT .....  | xx    |
| GLOSSAIRE .....   | xxi   |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE .....   | 1     |
| ÉTAT DES CONNAISSANCES .....  | 7     |
| 1. Evolution des traits .....   | 7     |
| 2. Matériel .....   | 38    |
| OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....   | 53    |
| 1. Quels sont les effets à court terme d'une pollution chronique en uranium ? ....  | 54    |
| 2. Quels sont les effets à court terme de l'uranium et du sel sur l'expression de la structure génétique des différents traits d'histoire de vie ?..... | 55    |
| 3. Quelle est la vitesse de réponse microévolutive des traits d'une population exposée à une pollution pendant plusieurs générations ?.....             | 56    |
| 4. La sélection entraîne-t-elle des coûts adaptatifs ?.....   | 57    |
| ARTICLE I   |       |
| RAPID PHENOTYPIC CHANGES IN <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> UNDER URANIUM EXPOSURE.....   | 59    |
| 1. Introduction .....   | 60    |
| 2. Material and Methods .....   | 63    |
| 3. Results.....   | 67    |
| 4. Discussion.....  | 72    |
| 5. Conclusion.....  | 78    |
| ARTICLE II  |       |
| POLLUTION BREAKS DOWN THE EXPRESSION OF GENETIC STRUCTURE OF LIFE HISTORY TRAITS IN <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> .....                                 | 79    |

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introduction .....  | 80  |
| 2. Material and methods .....  | 83  |
| 3. Results.....  | 88  |
| 4. Discussion.....   | 92  |
| 5. Conclusion.....   | 100 |
| ARTICLE III  |     |
| MULTIVARIATE ANALYSES OF EVOLUTIONARY CHANGES IN LIFE HISTORY TRAITS OF A <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> POPULATION EXPOSED TO POLLUTION..... | 101 |
| 1. Introduction .....  | 102 |
| 2. Material and methods .....  | 105 |
| 3. Results.....  | 114 |
| 4. Discussion.....   | 123 |
| 5. Conclusion.....   | 130 |
| ARTICLE IV   |     |
| BENEFITS AND COSTS OF ADAPTATION TO CONSTANT AND ALTERNATING POLLUTED ENVIRONMENTS.....  | 133 |
| 1. Introduction .....  | 134 |
| 2. Material and methods .....  | 139 |
| 3. Results.....  | 146 |
| 4. Discussion.....   | 158 |
| 5. Conclusion.....   | 167 |
| SYNTHÈSE DES RÉSULTATS .....   | 169 |
| 1. Cohérence des résultats .....   | 169 |
| 2. Changements de stratégie d'histoire de vie.....   | 172 |
| 3. Avantages et inconvénients .....  | 173 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....   | 179 |
| 1. Conclusion.....   | 179 |



|  |     |
|--|-----|
| 2. Perspectives .....  | 182 |
| COMMUNICATIONS ET FORMATIONS .....   | 187 |
| APPENDICES .....   | 191 |
| Appendix A – Comparison of N2 and Teotónio populations .....                         | 191 |
| Appendix B – Salt bioassay .....   | 194 |
| Appendix C – Additional Figures and Tables of article II .....                       | 198 |
| Appendix D – Automatic procedure to measure body length .....                        | 201 |
| Appendix E – Analyses of first generations .....                                     | 202 |
| Appendix F – Analyses for survival and sex ratio .....                               | 207 |
| Appendix G – Analyses of traits variance between replicates.....                     | 210 |
| Appendix H – Analyses of covariance in bivariate models .....                        | 217 |
| Appendix J – Pictures of <i>C. elegans</i> in the multigenerational experiment ..... | 218 |
| Appendix K – Relationship between fertility and growth.....                          | 219 |
| Appendix L – Additional Figure of article IV.....                                    | 221 |
| Appendix M – Heritability and evolutionary response.....                             | 222 |
| Appendix N – ICP-AES analyses in the multigenerational experiment .....              | 225 |
| REFERENCES.....  | 227 |



## LISTE DES FIGURES

| Figure   | Page |
|--|------|
| 1. Réponse d'un organisme en fonction de la concentration d'un élément essentiel à sa vie dans son environnement.....  | 15   |
| 2. Sensibilité environnementale du phénotype.....  | 23   |
| 3. Représentation d'une expérience de « jardin commun » et de transplantation réciproque.  | 24   |
| 4. Représentation graphique de la matrice de variance-covariance (G) entre deux traits (X et Y).....   | 35   |
| 5. Matrice G entre deux traits. ....   | 38   |
| 6. Photographie d'un mâle (A) et d'un hermaphrodite (B) chez <i>C. elegans</i> .....   | 43   |
| 7. Cycle de vie de <i>C. elegans</i> à 20°C .....  | 44   |
| 8. Observation de <i>C. elegans</i> sous une loupe binoculaire .....   | 45   |
| 9. Préparation du milieu de culture (NGM) contaminé avec de l'uranium .....  | 47   |
| 10. Transfert d'un individu d'un puits à un autre (plaque 12 puits).....   | 48   |
| 11. Résultats d'un modèle bayésien.....  | 52   |
| 12. Percentage of <i>C. elegans</i> surviving at generation P0 after 48 h of exposure to different U-concentrations.....   | 69   |
| 13. Changes in phenotypic traits (mean $\pm$ SD) of <i>C. elegans</i> exposed to different U-concentrations and across three generations .....   | 70   |
| 14. Brood size as a function of adult body length after 72 h of exposure to U-concentrations   | 71   |
| 15. Variance estimates with their 95% intervals of Bayesian credibility, for fertility (A) and early growth (B) measured on <i>C. elegans</i> in the control, the uranium, and the salt environment..... | 91   |
| 16. Evolutionary responses of hermaphrodite total fertility (A), growth (B), early (C) and late (D) fertility, and male growth (E) and body bend (F), between generation 4 and 22                        | 118  |
| 17. Changes in average population size between generation 1 and 22.....  | 120  |
| 18. Distribution of density of the angle ( $\theta$ ) between different periods .....  | 121  |
| 19. Distribution of density of the angle ( $\theta$ ) between different environments .....   | 122  |
| 20. Reciprocal-transplant experiment design and potential responses.....   | 138  |
| 21. Fitness (i.e. total fertility multiplied by survival frequency) at generation 1, 4 and 22 in the multigenerational experiment.....   | 149  |

|   |     |
|---|-----|
| 22. Total fertility (A), hermaphrodite growth (B), early fertility (C), late fertility (D), male body bend (E) and male growth (F) during five successive common-garden experiments conducted at generation 6, 9, 12, 15 and 18 of the multi-generation experiment..... | 151 |
| 23. Average traits values in the reciprocal-transplant experiment.....  | 156 |
| 24. Common-garden experiment comparing populations that have evolved within different environments for 23 generations and put in a control environment at two different temperature treatments (20 and 25°C) .....  | 157 |
| 25. Evènements évolutifs lors d'un changement environnemental brusque qui dure pendant plusieurs générations et ses conséquences sur la valeur sélective dans cet environnement ou dans un autre environnement.....   | 180 |

## LISTE DES TABLEAUX

| Tableau   | Page |
|---|------|
| 1. Présentation des deux mécanismes (acclimatation et adaptation) par lesquels les organismes font face à la présence d'un polluant dans leur environnement.....  | 14   |
| 2. Mécanismes impliqués dans les différences phénotypiques.....   | 25   |
| 3. Average trait values of 14 isogenic lines of <i>C. elegans</i> in the control, the uranium and in the salt environment.....  | 89   |
| 4. Matrices of heritabilities (diagonal), phenotypic (below the diagonal) and genetic correlations (above the diagonal) .....   | 91   |
| 5. Cross-environment genetic correlations .....   | 92   |
| 6. Effect of generation and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) on hermaphrodite (growth, total fertility, early, and late fertility) and male (growth body bend) traits, measured between generation 4 and 22 of the multigenerational experiment.....                              | 116  |
| 7. Analyses of difference of traits values for hermaphrodites and males in the multi-generational experiment between generation 4 and 22.....   | 117  |
| 8. Effect of generation and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) on population size measured between generation 1 and 22 of the multi-generational experiment.....  | 119  |
| 9. Measures of matrix eccentricity and size and their 95% highest and lowest of confidence intervals (CI), obtained by a resampling procedure, of matrices of (co)variance for hermaphrodite traits (total fertility, early and late fertility, and growth) in the control, the uranium and the salt environments ..... | 122  |
| 10. Comparison of models for traits measured in the different experiments .....   | 148  |
| 11. Analyses of differences of fitness (i.e. total fertility multiplied by survival frequency) in multigenerational experiment of selection between generation 1 and 4 and then between generation 4 and 22.....  | 149  |
| 12. Analyses of difference of traits values for hermaphrodites (A) and males (B) in five successive common-garden experiments in control environment conducted at generation 6, 9, 12, 15 and 18 of the multi-generation experiment.....  | 150  |
| 13. Analyses of difference of traits values between the populations that previously lived in the control or stressful (uranium, salt or alternating uranium and salt) environments for hermaphrodites and males, and in each novel environment (i.e. uranium or salt).....  | 155  |

|  |     |
|--|-----|
| 14. Analyses of difference of traits values between the populations that previously lived in the control or stressful (uranium, salt or alternating uranium and salt) environments for hermaphrodites and males, and at 25°C ..... | 155 |
| 15. Synthèse des résultats : articles II, III et IV .....  | 170 |
| 16. Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées.....   | 174 |

## RÉSUMÉ

Dans l'environnement, l'évolution contemporaine des organismes vivants est de plus en plus dépendante des perturbations d'origine anthropique. En particulier, la pollution amplifie l'intensité ou la quantité des pressions de sélection auxquelles sont soumises les populations. Or ces changements peuvent avoir des effets négatifs sur la vie, la reproduction et la croissance des individus. La démographie des populations peut aussi être affectée, tout comme au cours des générations, les caractéristiques phénotypiques et génétiques de ces populations. Ainsi en réponse aux pressions de sélection, des changements microévolutifs sont susceptibles de se manifester. Mais ces phénomènes entraînent en parallèle la mise en place de coûts adaptatifs. Par exemple, une réduction de la diversité génétique d'une population induit une diminution du potentiel adaptatif face à d'autres contraintes. Ceci peut fragiliser le maintien de populations vivant dans des environnements toujours plus changeants, notamment avec l'accroissement des activités humaines. Dans une démarche d'évaluation des risques écologiques, il ne suffit donc plus d'étudier les mécanismes d'action et les effets néfastes immédiats des polluants sur les organismes vivants. Il est également nécessaire de développer nos connaissances sur l'évolution des populations en milieu pollué, et plus globalement en milieu stressant.

Dans ce contexte, cette étude vise à déterminer les réponses microévolutives de populations d'un organisme modèle, *Caenorhabditis elegans*, exposées à des stress environnementaux et à mesurer les coûts adaptatifs de ces microévolutions. Ces populations ont été exposées expérimentalement, durant 22 générations, à une forte concentration en uranium, en chlorure de sodium ou à une alternance de ces deux polluants. L'analyse des modifications phénotypiques et génétiques observées, au travers des mesures de traits d'histoire de vie, a été accomplie grâce à plusieurs techniques de génétique quantitative. Nous avons notamment mis en évidence une différenciation génétique des populations exposées, associée à augmentation de la résistance, au cours du temps. La vitesse des réponses évolutives était dépendante des conditions d'exposition et de leurs effets sur l'expression de la structure génétique des traits (matrice **G**). Ces phénomènes microévolutifs ont pu être reliés à des coûts adaptatifs, tels qu'une réduction de la fertilité, dans de nouveaux environnements stressants (ex : augmentation de la température) ou en l'absence de stress. Ainsi, même après plusieurs générations sans la présence de polluant, les populations adaptées voient leur fragilité augmenter par rapport à des populations non adaptées. Toutefois, nous n'avons pas identifié de coûts supplémentaires pour les populations adaptées à l'environnement d'alternance par rapport à celles adaptées à une pollution constante. Ce projet nous a permis de mieux identifier comment une exposition à un ou deux polluants peut affecter la réponse



évolutive de populations de *C. elegans* et d'évaluer les conséquences sur leur sensibilité aux conditions environnementales.

**Mots-clés :** évolution expérimentale ; génétique quantitative ; coûts adaptatifs ; stress environnementaux ; traits d'histoire de vie ; structure génétique ; adaptation locale ; évolution du généralisme ; *Caenorhabditis elegans* ; pollution ; uranium

## ABSTRACT

The contemporary evolution of organisms is largely dependent on anthropogenic disturbances. In particular, pollution amplifies the intensity or the quantity of selection pressures on populations. However, these changes may have negative effects on the life, growth and reproduction of individuals, the demographics of the population, and its phenotypic and genetic characteristics over generations. Thus, microevolutionary changes are likely to occur in response to selection pressures. These phenomenon lead to collateral damages: adaptive costs. For example, a reduction of genetic diversity in a population entails a decrease in its potential to adapt to other stressors. Populations can be more susceptible to many environmental changes, especially with the increase of human activities. Hence in an ecological risk assessment, studying the mechanisms of action and immediate adverse effects of pollutants on organisms is no longer sufficient. It is also necessary to expand our knowledge on the evolution of populations in polluted environment.

In this context, our study aims to determine the microevolutionary response of *Caenorhabditis elegans* populations exposed to environmental stressors, and to measure their costs of adaptation. Populations were experimentally exposed for 22 generations to a high concentration of uranium, sodium chloride or an alternation of both these pollutants. The analysis of phenotypic and genetic changes, observed through measures of life history traits, was accomplished using several quantitative genetics techniques. In particular, we confirmed the genetic differentiation between populations with an increase of resistance in populations exposed to different pollutions. The speed of evolutionary responses depended on the conditions of exposure and their effects on the expression of the genetic structure of traits (e.g. **G** matrix). Microevolutionary changes were linked to costs of adaptation, such as reduced fertility in stressful novel environments (e.g. fast temperature increase) or in the absence of stress. Thus, even after several generations without the presence of pollutants, adapted populations are more susceptible than non-adapted populations. However, we did not identify any additional costs for populations adapted to the alternation environment compared to populations adapted to a constant pollution. This project allowed us to better identify how exposure to one or two pollutants affects the evolutionary response of *C. elegans* populations and evaluate the impact on their susceptibility to environmental conditions.

**Keywords:** experimental evolution; quantitative genetics; costs of adaptation; environmental stress; life history traits; genetic structure; local adaptation; evolution of generalism; *Caenorhabditis elegans*; pollution; uranium



## GLOSSAIRE

Cette section très succincte permet de définir quelques termes très importants pour la compréhension de ce manuscrit de thèse. Ces termes sont également définis dans le chapitre « État des connaissances », à travers le texte.

**Acclimatation** : changement plastique, phénotypique, des individus face à des nouvelles conditions de milieu. Ces phénomènes de plasticité phénotypique peuvent se produire au cours du développement d'un individu (plasticité phénotypique développementale) ou entre les générations (par le biais d'effets maternels).

**Adaptation locale** : différenciation génétique et phénotypique d'une population au cours du temps, face aux conditions environnementales d'une zone géographique particulière, pour améliorer la valeur sélective des individus qui constituent cette population.

**Coût adaptatif** : réduction de la valeur sélective des individus dans un environnement particulier après qu'ils se soient adaptés à un environnement différent.

**Effet maternel** : influence des facteurs environnementaux de la mère (qualité des soins maternels, carence alimentaire de la mère, polluant ingéré par la mère et transmis au jeune, etc.) sur le phénotype de ses descendants.

**Evolution expérimentale** : expérience réalisée en laboratoire ou en milieu naturel, sur plusieurs générations, et qui permet de comprendre les processus de sélection et leurs conséquences sur le devenir des populations.

**Héritabilité** : proportion de variance phénotypique d'une population qui sera transmise à la génération suivante.

**Matrice G ou de variance-covariance génétique** : matrice caractérisant les associations linéaires (covariances génétiques) entre les différents traits d'une population dues à des effets génétiques communs.

**Microévolution** : changements génétiques au sein d'une population et observés sur une échelle de temps relativement. En revanche, la **macroévolution** concerne des

changements au-dessus du niveau de l'espèce et porte principalement sur les phénomènes de spéciation et d'évolution des groupes d'espèces sur une échelle de temps géologique.

**Plasticité phénotypique** : capacité d'un génotype à s'engager dans des trajectoires de développement différentes en fonction des conditions environnementales. Elle permet la production d'un ensemble de phénotypes à partir d'un seul génotype.

**Polluant** : altérage biologique, physique ou chimique, qui engendre des effets négatifs sur tout ou une partie d'un écosystème. Ainsi, alors que le **contaminant** se définit comme toute substance décelée dans un lieu où il ne se trouve pas normalement, le polluant quant à lui, est un contaminant ayant un effet sur l'écosystème.

**Pression de sélection** : phénomène apporté par des contraintes environnementales qui, sous certaines conditions, peut induire une évolution des espèces.

**Résistance** : réponse génétique directionnelle. Les organismes résistants sont génétiquement différenciés des individus de la même espèce qui ne subissent pas le stress. A l'opposé, la **tolérance** est la mise en place de certains mécanismes pour faire face à un stress, avec une tendance à revenir vers la normalité en l'absence du stress (sans différenciation génétique).

**Stress environnemental** : pression (ou contrainte) naturelle ou induite par une activité anthropique sur les organismes.

**Trait d'histoire de vie** : caractéristique phénotypique des individus liée à leur valeur sélective.

**Variance phénotypique** : variance d'un trait dans une population et dépendante d'effets génétiques, environnementaux et de leurs interactions.

**Valeur sélective** : capacité d'un individu à transmettre son génotype, c'est-à-dire capacité à vivre et à se reproduire (= fitness en anglais)

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'adaptation locale représente la différenciation génétique et phénotypique, au cours de l'évolution, de populations soumises à des pressions sélectives d'un environnement délimité géographiquement. Ainsi, en présence d'adaptation locale, chaque population se caractérise par un ensemble de particularités génétiques et phénotypiques. Celles-ci confèrent aux individus de la population une meilleure valeur sélective (= fitness en anglais, c'est-à-dire la capacité à transmettre son génotype), par rapport aux autres populations, face aux conditions environnementales locales (Hedrick, 2006 ; Hendry & Gonzalez, 2008).

La sélection naturelle, un mécanisme largement reconnu pour être la cause principale des changements évolutifs adaptatifs, est à l'origine de ces phénomènes (Miaud & Merilä, 2001 ; Hendry *et al.*, 2007 ; Hendry *et al.*, 2008). En revanche, la dérive génétique, qui est un mécanisme de changements intergénérationnels aléatoires des fréquences alléliques dans une population, peut conduire à la différenciation génétique des populations. Mais elle n'aura pas de conséquence adaptative sur les populations (Alleaume-Benharira *et al.*, 2006). A l'inverse de la sélection et de la dérive génétique, le flux de gènes et d'individus entre les populations réduira généralement le potentiel de différenciation entre les populations (Garant *et al.*, 2007).

La pollution peut jouer un rôle important dans la sélection naturelle. Le stress induit par la toxicité d'un polluant amplifie l'intensité ou la quantité des pressions de sélection subies par les organismes. Or, plus les pressions de sélection sont fortes et

directionnelles, plus les divergences seront importantes (Hendry & Gonzalez, 2008). Cette amplification des pressions peut alors engendrer, en quelques générations et par le biais des processus microévolutifs, une spécialisation des populations. Il en résulte, pour ces populations, une plus grande résistance au polluant, c'est-à-dire, une aptitude accrue, génétiquement acquise, à supporter son action défavorable jusqu'à un certain seuil (Posthuma & Van Straalen, 1993 ; Shirley & Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Medina *et al.*, 2007 ; Eränen, 2008 ; Lopes *et al.*, 2008).

Cependant, observer des changements phénotypiques au sein d'une population, ne signifie pas systématiquement que des processus microévolutifs soient à l'origine de tels changements. En effet, suite à l'exposition d'une population à un polluant, les modifications phénotypiques observées sur un faible nombre de générations peuvent être la conséquence de trois phénomènes : (i) l'acclimatation, correspondant à un changement plastique, phénotypique, des individus face à des nouvelles conditions de milieu (ces phénomènes de plasticité phénotypique peuvent se produire entre les générations par le biais d'effets maternels) ; (ii) les processus adaptatifs impliquant des changements génétiques à l'intérieur de la population au cours des générations (c'est-à-dire les processus microévolutifs) ; (iii) la dérive génétique, si la sélection se traduit par une forte réduction de la densité de population. Contrairement aux deux premiers, le dernier phénomène est aléatoire (Falconer & Mackay, 1996). Il est donc important d'analyser les mécanismes, adaptatifs et non-adaptatifs, responsables des changements de population afin d'appréhender l'importance relative de chacun de ces mécanismes et les conséquences écologiques de l'exposition chronique de populations à un polluant (voir Tableau 1 dans le chapitre « État des connaissances »).



Une grande majorité des travaux menés en écotoxicologie se sont focalisés dans le passé – et encore actuellement – sur l'étude des effets des polluants à l'échelle de l'individu. Toutefois, l'étude de perturbations induites par les polluants à l'échelle de la population est écologiquement plus pertinente, et devient essentielle lorsque les durées d'exposition sont supérieures à la durée de vie des organismes (Nisbet *et al.*, 1989). L'évaluation des risques associée à l'exposition chronique à un polluant, sur l'extinction de populations et le maintien de la biodiversité, est devenue une préoccupation de toute première importance depuis l'avènement de l'ère industrielle moderne. Pour mesurer ces risques, il est donc essentiel d'étudier les changements phénotypiques et génétiques des populations induits, sur plusieurs générations, par des perturbations environnementales. Par ailleurs, pour être écologiquement pertinent, il est nécessaire d'évaluer les effets combinés des polluants et d'autres types de stress environnementaux. En effet, au sein de nombreux écosystèmes, les populations sont souvent soumises à diverses contraintes, simultanément ou en alternance. Par exemple, les effets indirects des polluants sur les populations peuvent se traduire à l'échelle des écosystèmes par des variations démographiques des proies, des prédateurs ou de compétiteurs de l'espèce étudiée (Fleeger *et al.*, 2003 ; Denoël *et al.*, 2010). Ce sont donc des pressions de sélection supplémentaires dues au polluant. D'autre part, indépendamment de l'action du polluant, d'autres stress d'origines anthropiques tels que les changements climatiques, la destruction et la modification d'habitats, l'apparition d'espèces envahissantes, la surexploitation des ressources naturelles peuvent se rajouter à la situation évolutive considérée (Lynch & Lande, 1993 ; Palumbi, 2001 ; Bell & Collins, 2008).

Dans ce contexte, ce projet de recherche vise à déterminer les réponses microévolutives des traits d'histoire de vie de populations de *Caenorhabditis elegans* exposées à des stress environnementaux, et à mesurer les coûts de ces microévolutions sur la valeur sélective

des individus dans de nouveaux environnements stressants ou en l'absence de stress. Nous nous sommes focalisés sur deux polluants : l'uranium et le sel. L'extraction de l'uranium est très importante dans des pays tels que le Canada, l'Australie ou les Etats-Unis et l'a aussi été en France. Cette exploitation minière est source de pollution. Ainsi, de nombreux écosystèmes continentaux ont vu leur concentration en uranium augmenter (Ragnarsdottir & Charlet, 2000 ; Bonin & Blanc, 2001). De même, les concentrations en sel augmentent dans certains écosystèmes à cause, en particulier, de l'irrigation intensive de terres cultivées (Rengasamy, 2006 ; Verwey & Vermeulen, 2011). De plus, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'adaptation de ces populations à ces environnements pollués face à un nouveau stress : une augmentation de la température de leur milieu de vie. A cause du réchauffement climatique global de la planète, ce changement environnemental a un intérêt tout particulier pour les scientifiques (IPCC, 2007). Notre modèle biologique dans cette étude est *C. elegans*, un nématode terrestre très connu des biologistes et étudié dans différents domaines, tels que la biologie du développement, la génétique ou encore la biologie moléculaire (Brenner, 1974 ; Araiz *et al.*, 2008). De plus, cet organisme se prête extrêmement bien aux études d'évolution expérimentale, car, entre autres, son cycle de vie est inférieur à trois jours (Braendle *et al.*, 2008).

La présentation de cette thèse s'organise autour de quatre articles scientifiques. Le 1<sup>er</sup> article présente les résultats sur les effets de l'uranium sur trois générations d'une population de *C. elegans*. L'acquisition de ces premiers résultats était primordiale pour déterminer au mieux les concentrations en polluants à utiliser lors des expériences suivantes. Grâce à des outils de génétiques quantitative, la structure génétique des traits d'histoire de vie a été déterminée au sein de populations exposées à des environnements pollués par de l'uranium et du sel. Ainsi il a été possible de déterminer le potentiel

évolutive des populations exposées à ces polluants. Ceci constitue le 2<sup>ème</sup> article. Nous avons abordé, dans le 3<sup>ème</sup> article, l'étude des modifications phénotypiques de populations exposées à différentes pollutions (uranium, sel ou alternance des deux polluants) pendant 22 générations. Cette étude avait pour but principal de comparer la vitesse de réponse microévolutive des traits dans ces environnements. Nous avons finalement été amenés, dans le 4<sup>ème</sup> article, à réaliser des expériences en jardins communs et de transplantations réciproques pour identifier les coûts de l'adaptation aux pollutions, dans un environnement non stressant (contrôle) ou dans de nouveaux environnements stressants (uranium, sel et augmentation de la température).

Pour appréhender au mieux notre problématique, le lecteur est tout d'abord invité à découvrir un premier chapitre qui détaille les connaissances actuelles sur la biologie évolutive ainsi que le matériel et les méthodes en lien avec ce présent travail. Par la suite, dans un deuxième chapitre, nous exposons les objectifs spécifiques de cette étude.



## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1. Evolution des traits

#### 1.1. Evolution expérimentale

##### 1.1.1. Origine et présentation

Une manière d'étudier les processus d'évolution est de placer expérimentalement une population dans une situation différente de son milieu de vie (situation contrôlée et répliquée) et de mesurer au sein de cette population les changements d'un certain nombre de traits phénotypiques après plusieurs générations (Kawecki *et al.*, 2012). Cette approche est communément appelée « évolution expérimentale ». Il semblerait qu'elle fut mise en œuvre la première fois en 1878 par Dallinger. Celui-ci cherchait à confirmer la théorie darwinienne de l'évolution (Haas, 2000) en faisant évoluer une population de micro-organismes unicellulaires soumise à une augmentation de température (Dallinger, 1878). Aujourd'hui, l'évolution expérimentale qualifie toute expérience réalisée en laboratoire ou en milieu naturel, sur plusieurs générations, et qui permet de comprendre les processus de sélection et leurs conséquences sur le devenir des populations (Fuller *et al.*, 2005 ; Kawecki *et al.*, 2012). Ce qui exclut de fait les expériences de sélection artificielle où les individus reproducteurs sont sélectionnés sur un trait phénotypique précis (ou même des marqueurs spécifiques de locus) forçant une relation entre le trait (ou génotype) et sa valeur sélective. A l'inverse, dans les expériences de sélection naturelle en laboratoire, la sélection peut agir sur une combinaison de gènes et de traits permettant d'avoir la meilleure valeur sélective possible dans le nouvel environnement.

L'évolution expérimentale s'intéresse à des phénomènes microévolutifs et non macroévolutifs, pour des raisons de temps. En effet, la microévolution concerne des changements génétiques au sein d'une population et observés sur une échelle de temps relativement courte (c'est-à-dire d'une dizaine à plusieurs centaines de générations). En revanche, la macroévolution concerne des changements au-dessus du niveau de l'espèce et porte principalement sur les phénomènes de spéciation et d'évolution des groupes d'espèces sur une échelle de temps géologique. La distinction repose donc essentiellement sur une différence d'échelle de temps mais les deux phénomènes sont reliés au même processus d'évolution (Hendry & Kinnison, 1999, 2001). Contrairement aux phénomènes macroévolutifs qui nécessitent généralement l'approvisionnement régulier de nouvelles mutations, les phénomènes microévolutifs ne peuvent se faire que par la sélection sur la variation génétique déjà présente dans la population (= *standing genetic variation* en anglais), c'est-à-dire la présence de plus d'un allèle à un locus dans la population (Barrett & Schluter, 2008). L'adaptation est plus rapide lorsqu'elle est due à une sélection sur la variation génétique préexistante plutôt que par l'acquisition de nouvelles mutations bénéfiques. Nous définissons par adaptation, une différenciation génétique et phénotypique d'une population au cours du temps, face à de nouvelles conditions environnementales, pour améliorer la valeur sélective des individus qui constituent cette population (le terme adaptation doit être compris dans ce sens tout long de ce manuscrit). La mutation bénéfique ne survient que chez un individu et doit encore se répandre dans la population durant de nombreuses générations avant de transformer génétiquement la population (West-Eberhard, 2003). Les allèles bénéfiques, eux, sont non seulement déjà présents dans la population mais leur fréquence est plus forte (Innan & Kim, 2004). De plus, ces allèles bénéfiques déjà présents ont été testés dans des environnements passés par les populations ancestrales (Rieseberg *et al.*, 2003). Ainsi, la variation génétique a subi un filtre sélectif ce qui accroît les chances de la population de

posséder des allèles avantageux à large effet (Liti *et al.*, 2006 ; McGregor *et al.*, 2007) et la probabilité d'évolution en parallèle et répétée d'écotypes (Schluter, 2000 ; Schluter *et al.*, 2004). Cette évolution se fait par l'entrée répétée d'individus ancestraux dans de nouveaux environnements mais où les pressions de sélection sont les mêmes. Les écotypes sont des populations génétiquement adaptées à des conditions environnementales spécifiques, donc des sous-unités d'une espèce.

#### 1.1.2. Facteurs indispensables

Kawecki *et al.* (2012) ont répertorié les facteurs primordiaux à considérer pour entreprendre une étude de biologie évolutive expérimentale. Dans le cadre de ce travail, voici ceux que nous avons plus particulièrement retenus :

(i) Le modèle biologique utilisé doit avoir un cycle de vie court et doit être facilement manipulable en laboratoire. Cependant, à l'issue de l'expérience, les réponses obtenues ne doivent pas être spécifiques d'une espèce ou d'une population de laboratoire, déjà adaptées aux conditions particulières de laboratoire.

(ii) Le taux de mutation n'étant pas suffisant pour être une force évolutive dominante lors d'études sur quelques dizaines de générations (Mackay *et al.*, 1994 ; Denver *et al.*, 2009), la diversité génétique de la population d'origine est extrêmement importante. En revanche, les études où les mutations bénéfiques sont la cause première des changements génétiques peuvent être réalisées avec des populations composées d'une simple souche (Barrett & Schluter, 2008 ; Bell & Gonzalez, 2009), c'est-à-dire où les individus ont le même bagage génétique. Les changements évolutifs par sélection naturelle sont



subordonnés à la variation génétique initiale. Le nombre d'individus utilisés, provenant de la population naturelle de départ, doit donc être suffisant. Les populations naturelles abriteront probablement plus de polymorphismes, y compris des allèles rares, que les souches de laboratoire cultivées pendant plusieurs générations dans les mêmes conditions. Il est aussi possible de croiser des individus issus de différentes populations naturelles ou de lignées de laboratoire pour accroître la variabilité génétique. Toutefois, cela peut engendrer des déséquilibres de liaison qui peuvent alors rendre complexe l'interprétation des résultats en fonction de la problématique abordée (Teotónio *et al.*, 2012). Une dernière possibilité est de travailler avec plusieurs populations séparées. Dans ce cas, la puissance statistique des résultats sera réduite car les populations répondront différemment (bagage génétique différent) mais cela ajoute à la généralisation des conclusions.

(iii) La taille de la population doit être suffisante pour laisser le temps à la sélection d'agir. Alors que les expériences sur des populations de micro-organismes permettent de travailler avec des tailles de populations dépassant le million, les tailles de populations expérimentales chez les métazoaires sont limitées à des milliers, centaines, voir moins d'individus. Or, la taille de la population de départ peut avoir des répercussions par l'action de la dérive génétique (Willi & Hoffmann, 2009).

(iv) En revanche, le nombre de générations requises peut être très faible. Des études ont montré que les divergences dans les valeurs moyennes de traits, lorsque des populations sont soumises à des pressions de sélection fortes, peuvent survenir en quelques générations. Certaines études présentent des réponses significatives en trois à six générations seulement (par exemple : Xie & Klerks, 2003 ; Salice *et al.*, 2010). Toutefois les expériences visant à détecter les changements de variance (Lenski *et al.*, 1991) ou pour

observer le taux de mutation (Sniegowski *et al.*, 1997) nécessitent généralement des centaines de générations.

(v) En plus des environnements de sélection, il est nécessaire de mettre en place des environnements contrôles (c'est-à-dire sans sélection), afin de pouvoir réaliser des comparaisons. Toutefois, puisque ces conditions expérimentales ne sont jamais identiques aux conditions environnementales naturelles, il est important de réaliser des comparaisons avec la population ancestrale, ou *a minima* avec la population au début de l'expérience.

(vi) Le nombre de répliquats, dont l'unité de base est la population ici, doit être suffisant. En effet, en dehors de leur intérêt évident pour analyser au mieux statistiquement les données, les répliquats permettent de vérifier qu'il n'y a pas de divergence dans les populations répliquées due à des effets de dérive génétique.

### 1.1.3. Contraintes et limites

Dans le cadre d'une étude d'évolution expérimentale, généralement, les individus sont placés dans des conditions défavorables ou très différentes des conditions dans lesquelles ils vivent habituellement. Ainsi, ce sont les pressions de sélections directionnelles, induites par ces conditions défavorables, qui constituent la force évolutive majeure étudiée (Kawecki *et al.*, 2012). Il faut cependant souligner que dans d'autres recherches l'accent a été mis sur les autres forces évolutives que sont les mutations (Cooper & Lenski, 2000), la dérive génétique (Rundle, 2003) et le flux de gènes (Kawecki & Ebert, 2004). Dans l'environnement, ces forces vont généralement agir sur les populations

naturelles, en plus de la sélection naturelle. Il est toutefois possible de les contrôler en laboratoire, ce que nous avons entrepris dans nos expériences.

Quand on étudie une population à reproduction sexuée, il est important de s'assurer que la dépression de consanguinité ne joue pas un rôle primordial dans les changements génétiques au cours du temps. Cette dépression risquant d'être plus importante dans l'environnement contrôle ou dans des régimes de sélection faible. Les populations dans les régimes de sélection à plus fortes pressions de sélection auront une taille effective de population plus petite, conduisant à un plus grand degré de consanguinité (Santiago & Caballero, 1998).

Il est indispensable de conserver des environnements dans des conditions standardisées et d'éviter au maximum l'introduction de contamination bactérienne par exemple, ce qui est plus délicat à atteindre lors d'études sur des interactions hôtes-parasites (Ebert & Mangin, 1997) ou dans toutes études où la stérilisation du milieu s'avère difficile. Il est également nécessaire de s'assurer que les résultats obtenus ne sont pas simplement dus aux conditions de laboratoire particulières. Nous pouvons citer la sélection pour la résistance au manque de nourriture chez la drosophile qui conduit à une activité locomotrice réduite. Ce comportement est adaptatif en laboratoire car les individus qui résistent le mieux finissent toujours par recevoir de la nourriture. Or, une activité locomotrice réduite, permet aux drosophiles de résister plus longtemps au manque de nourriture à travers une économie de leur dépense énergétique. Cependant, un manque de nourriture dans la nature va souvent favoriser une augmentation de la mobilité pour trouver de nouvelles ressources. En effet, de manière plastique, les individus sauvages deviennent très actifs quand ils sont privés de nourriture (Williams *et al.*, 2004).

Puisque dans la nature, les populations subissent de nombreuses contraintes simultanément, la sélection peut agir sur de très nombreux traits phénotypiques à la fois. Ainsi l'adaptation dans la nature est plus susceptible d'impliquer des allèles qui montrent peu d'effets pléiotropiques (un locus affectant au moins deux traits phénotypiques) néfastes. A l'inverse, en laboratoire il n'y aura qu'une seule contrainte forte. Par conséquent, les effets pléiotropiques qui seraient délétères dans la nature peuvent être neutres ou presque, en laboratoire. C'est le cas, par exemple pour une population de levures qui ne subit pas de conséquence évidente lors de la suppression complète de la plupart de ses gènes ( $\sim 80\%$ ) dans les conditions optimales de laboratoire (Hillenmeyer *et al.*, 2008).

Depuis moins de 10 ans, nous savons maintenant que certaines informations sont considérées quasi-héréditaires car elles correspondent à des modifications du patron d'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique, telle que la méthylation de l'ADN. Ce sont les phénomènes épigénétiques. La persistance intergénérationnelle d'effets épigénétiques après une modification environnementale lors de la première génération a été plusieurs fois démontrée chez des plantes ainsi que chez le rat (Anway *et al.*, 2005 ; Molinier *et al.*, 2006). Ces phénomènes commencent à être intégrés dans le cadre de la théorie évolutive, notamment à travers l'évolution expérimentale (Day & Bonduriansky, 2011), puisqu'ils peuvent biaiser l'interprétation des résultats sur l'adaptation des populations.

#### 1.1.4. Evolution en condition de stress

Un stress environnemental est une pression (ou une contrainte) naturelle ou bien induite par une activité anthropique sur les organismes. Certaines espèces montrent une grande

capacité d'adaptation. Alors elles survivent et se reproduisent même dans des environnements très stressants. Ces adaptations peuvent se traduire par une résistance accrue (Tableau 1).

Tableau 1. Présentation des deux mécanismes (acclimatation et adaptation) par lesquels les organismes font face à la présence d'un polluant dans leur environnement.

Description de ces mécanismes et implications pour les populations ; d'après McGrath (2001) et Morgan *et al.* (2007).

| Acclimation   | Adaptation  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tolérance<sup>1</sup></li> <li>• La réponse au stress survient pendant la vie de l'individu</li> <li>• Les réponses sont induites</li> <li>• Plasticité phénotypique</li> <li>• La plasticité phénotypique est génétiquement déterminée</li> <li>• La descendance élevée dans l'environnement contrôlé peut s'acclimater si le stress est transféré de la mère à l'embryon</li> <li>• La valeur de trait est perdue si le stress est retiré</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Résistance<sup>1</sup></li> <li>• La réponse au stress évolue au cours des générations d'exposition</li> <li>• Les réponses sont constitutives</li> <li>• Les adaptations sont héréditaires, résultant de la sélection directionnelle</li> <li>• Les populations différenciées génétiquement sont des écotypes</li> <li>• Les organismes adaptés peuvent avoir une valeur sélective plus faible que ceux non adaptés dans un nouvel environnement : coût adaptatif</li> <li>• Le retrait du stress entraîne un retour vers un état non adapté (si l'adaptation a un coût sur la valeur sélective) sur de nombreuses générations</li> </ul> |

<sup>1</sup>Puisque les définitions des termes résistance et tolérance sont souvent mal déterminées et qu'elles se chevauchent partiellement, nous décidons d'utiliser la définition présentée par Morgan *et al.* (2007). La tolérance implique la mise en place de certains mécanismes pour faire face à un stress, avec une tendance à revenir vers la normalité en l'absence du stress. La résistance renvoie à une réponse génétique directionnelle. Les organismes résistants sont génétiquement différenciés des individus de la même espèce qui ne subissent pas le stress.

Lorsqu'un élément chimique est présent dans un écosystème, les effets sur la population vont dépendre de sa concentration (Figure 1). Dans le cas d'un élément essentiel à la vie des êtres vivants, si sa concentration est insuffisante, les individus subiront une carence. En revanche, si cet élément est à une concentration au-delà de ce qui est nécessaire à l'organisme ou si cet élément est non essentiel à la vie – mais à très faible concentration –, alors l'organisme peut y répondre sans subir d'effet négatif. Ce dernier peut alors se maintenir grâce à son homéostasie, c'est-à-dire sa capacité à conserver un équilibre dans ses activités biologiques malgré les contraintes extérieures. La résistance acquise est donc une augmentation du seuil où la concentration de l'élément devient toxique. Toutefois,



si la concentration est trop importante, elle peut devenir toxique pour l'organisme. Il faut noter qu'il existe aussi des molécules sans seuil de dose (par exemple les perturbateurs endocriniens), c'est-à-dire qu'elles agissent quelle que soit leur concentration, même infime (AFSSET, 2010).

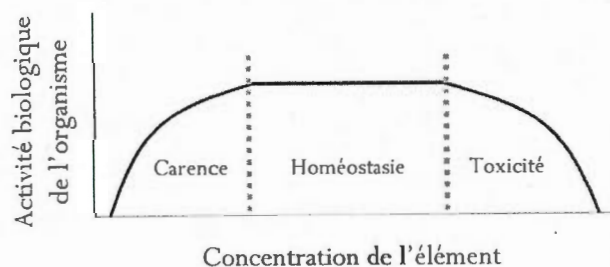


Figure 1. Réponse d'un organisme en fonction de la concentration d'un élément essentiel à sa vie dans son environnement.

Aucune gamme de carence n'existe pour un élément non essentiel, voir même aucune gamme de maintien par homéostasie pour des molécules sans effet de dose ; d'après McGrath (2001).

La sélection engendrée par des contraintes, tels que des polluants, est généralement directionnelle (Morgan *et al.*, 2007 ; Coutellec & Barata, 2011). Souvent la sélection directionnelle se produit lors d'un changement d'environnement (migration de la population ou changement brusque des conditions environnementales) où les pressions de sélection sont différentes. C'est un mode de sélection naturelle dans lequel un seul phénotype est favorisé, ce qui est provoqué par un déplacement des fréquences alléliques dans une direction (c'est-à-dire une augmentation ou une réduction). L'augmentation de la fréquence des allèles avantageux est indépendante de leur niveau de dominance par rapport aux autres. Cela signifie que même un allèle récessif avantageux finira par être fixé. Les pressions de sélection peuvent être de différentes natures, comme par exemple : le niveau de nutrition (Kolss *et al.*, 2009), la température (Van Doorslaer *et al.*, 2009), les parasites (Schulte *et al.*, 2010), une pollution par un métal lourd (Xie & Klerks, 2003)

ou un pesticide (Lopes *et al.*, 2008). Toutefois, il ne faut pas oublier qu'il existe dans la nature d'autres types de sélection très répandus, comme la sélection disruptive, stabilisante ou équilibrée (Kingsolver *et al.*, 2001).

Posthuma & Van Straalen (1993) ont réalisé une revue concernant les travaux mettant en évidence des adaptations aux milieux terrestres pollués, chez plusieurs invertébrés. Des pressions de sélection directionnelle causées par la présence de stress dans l'environnement conduisent très souvent à l'accroissement de la résistance des populations. La rapidité de l'acquisition de cette résistance révèle également la force des pressions induites. Par exemple, lors d'une expérience de sélection naturelle en laboratoire, des populations de *Drosophila melanogaster* Meigen ont été maintenues dans un milieu pollué en cadmium (Cd) ou non (Shirley & Sibly, 1999). Après seulement 20 générations, les individus issus des milieux pollués avaient une meilleure valeur sélective en présence de ce polluant que les individus issus du milieu témoin. La base génétique de cette résistance serait due, d'après les analyses de croisements entre les lignées, à une augmentation de la synthèse de métallothionéines des populations exposées au Cd. De même, Ward & Robinson (2005) ont exposé à du Cd des populations de *Daphnia magna* Straus. Une augmentation de la résistance a aussi été mise en évidence, notamment à travers l'augmentation de la CL<sub>50</sub> (c'est-à-dire la concentration létale pour 50 % des individus) à 48h, au fil des générations.

Les pesticides, particulièrement utilisés dans le domaine de l'agriculture, sont une préoccupation écologique majeure car ils affectent le maintien de la biodiversité (Vitousek *et al.*, 1997 ; Palumbi, 2001). Ayant été spécifiquement conçus pour nuire à des populations d'espèces nuisibles, cela fait des pesticides des agents sélectifs majeurs dans l'environnement. L'adaptation génétique peut donc survenir très rapidement chez



les populations naturelles (Carrière *et al.*, 1994 ; Coustau *et al.*, 2000 ; ffrench-Constant, 2007). L'acquisition d'une résistance aux pesticides chez les espèces cibles est un thème de recherche important en biologie évolutive appliquée. En effet, le risque de perdre des moyens de lutte contre les espèces nuisibles est loin d'être négligeable (Raymond *et al.*, 2001). Ainsi, les exemples sont nombreux pour montrer que l'adaptation à la pollution est possible, mais comme nous allons le voir maintenant, elle n'est pas sans conséquence.

#### 1.1.5. Importance du régime de sélection sur le coût de l'adaptation

Dans des conditions défavorables, certains phénomènes tels que l'augmentation des taux de mutation et de recombinaison peuvent accroître la variabilité génétique. A l'inverse, la sélection réduit la variabilité génétique en supprimant les allèles conférant une valeur sélective réduite (Hoffmann & Merilä, 1999), c'est-à-dire l'élimination des individus sensibles au stress. Par ailleurs, il peut aussi y avoir une sélection de génotypes produisant des stratégies coûteuses. Par exemple, une sélection peut se faire sur l'augmentation de l'allocation énergétique vers des mécanismes de détoxification, utile dans un environnement pollué. Cependant cette allocation peut être maintenue même lorsque le polluant n'est plus présent dans l'environnement (Kraaijeveld & Godfrey, 1997 ; Burdon & Thrall, 2003). L'acquisition de la résistance à un stress va donc généralement s'accompagner d'un coût dont la nature est génétique (voir l'introduction de l'article IV pour plus de détails).

Que ce soit des individus de populations de *D. melanogaster*, *D. magna* ou *C. elegans*, après l'adaptation à la pollution et lorsque les individus sont replacés dans un milieu non contaminé, ils ont une valeur sélective plus faible que les individus contrôles (Shirley &

Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Schulte *et al.*, 2010). C'est une conséquence qui peut directement être reliée à la diminution de la diversité génétique des populations (Reed & Frankham, 2003). Les populations adaptées à un environnement contraignant peuvent aussi subir des effets négatifs plus forts que des populations non adaptées, face à de nouvelles contraintes comme une élévation de la température (Xie & Klerks, 2003 ; Salice *et al.*, 2010), la présence de parasites (Jansen *et al.*, 2011b) ou d'autres polluants (Ward & Robinson, 2005). Toutefois si le nouveau stress fait intervenir les mêmes mécanismes de défense, il est possible que la population adaptée réagisse mieux à la nouvelle contrainte (Xie & Klerks, 2003 ; Ward & Robinson, 2005). Il existe aussi des études où aucun coût adaptatif n'a pu être mis en évidence. Coustau *et al.* (2000) ont présenté une revue sur ce phénomène, notamment avec des xénobiotiques. La présence de coûts adaptatifs n'est donc pas systématique, et en particulier lorsque les populations sont replacées dans un environnement favorable après l'adaptation au stress (Reznick *et al.*, 2000 ; Lopes *et al.*, 2008). Cet aspect sera présenté plus en détail dans l'article IV de ce manuscrit.

Dans les populations sauvages, l'héritabilité augmente dans les conditions les plus favorables et pour les traits morphométriques, et diminue pour les traits d'histoire de vie (Charmantier & Garant, 2005). Dans des conditions environnementales stables, favorables ou non, la sélection tend à réduire la variation des traits quantitatifs, jusqu'à ce que l'environnement change et altère le paysage adaptatif. Les conséquences sur la population vont être dépendantes de la stratégie évolutive vers laquelle les génotypes tendent en fonction du régime de sélection (Thomas *et al.*, 2010) : (i) la spécialisation (production d'un phénotype unique et adapté à une condition) lorsque les pressions de sélection sont constantes ; (ii) la généralisation (production d'un phénotype unique, intermédiaire, modéré et adapté à diverses conditions) lorsque les pressions de sélection

sont peu variables ; (iii) la plasticité phénotypique adaptative (production de plusieurs phénotypes, alternatifs selon les conditions) lorsque les pressions de sélection sont variables, mais prédictibles ; (iv) la répartition des risques (production aléatoire de plusieurs phénotypes ; bet-hedging en anglais) lorsque les pressions de sélection sont variables et imprédictibles.

Bien qu'elle permette la production de phénotypes mieux adaptés à différentes conditions, la stratégie plastique n'est pas toujours la stratégie qui est favorisée. La plasticité phénotypique permet aux individus de mieux faire face aux différents environnements, mais seulement si trois conditions sont réunies. D'abord, le phénotype produit doit être dépendant d'informations environnementales fiables. Par exemple, la phénologie des arbres est déterminante pour la coloration des chenilles chez le lépidoptère *Nemoria arizonaria*, (Greene, 1989). Les chenilles se nourrissent préférentiellement de fleurs, une ressource éphémère, mais aussi de feuilles. La coloration des chenilles, leur servant de camouflage, est dépendante de leur ressource nutritive qui contient une concentration faible (fleurs) ou forte (feuilles) en tanins. Bien que la température et la photopériode soient de bons signaux pour connaître la phénologie de l'arbre, ils ne déclenchent pas de réponse plastique. Ensuite, l'expression d'un phénotype particulier à un environnement doit améliorer la valeur sélective des individus. La dernière condition et la plus importante, est l'absence de contraintes. Par exemple, la pléiotropie peut empêcher la production d'un phénotype optimal. En effet, le trait d'intérêt peut être pris dans un compromis évolutif (= trade-off en anglais) avec un autre trait. Or, la sélection s'exerce aussi sur le trait corrélé. Un changement phénotypique du trait d'intérêt est donc possible mais exige un changement phénotypique de l'autre trait. La plasticité du trait d'intérêt est d'autant plus restreinte que le second trait est étroitement relié à la valeur sélective des individus (Thomas *et al.*, 2010).

S'ajoute à ces trois conditions le fait que la plasticité phénotypique est très coûteuse (coûts de maintenance, de production, d'acquisition de l'information, etc.) et que d'autres contraintes (par exemple fonctionnelles ou physiologiques) limitent son avantage et donc sa sélection (Via & Lande, 1985 ; DeWitt *et al.*, 1998).

Du fait de l'hétérogénéité environnementale, les populations sont beaucoup plus susceptibles de subir l'effet de plusieurs pressions de sélection agissant dans des directions opposées (Levins, 1968 ; Hedrick, 1974, 1976, 1986). Ceci entraîne des effets spécifiques sur la variabilité génétique des populations avec notamment une réduction de leur spécialisation aux conditions environnementales (voir l'article III pour plus de détails). Par exemple, un habitat pollué de manière hétérogène, avec des zones de contaminations faibles et fortes, peut favoriser la sélection de génotypes plastiques plutôt que spécialisés à la résistance à cette pollution (Morgan *et al.*, 2007). Ainsi, par rapport à un environnement constant, les coûts d'adaptation à un environnement fluctuant peuvent être très différents. Reed *et al.* (2003) ont étudié chez une population de *D. melanogaster* l'effet de l'environnement où la population s'est adaptée sur la réponse évolutive et la valeur sélective des individus dans un nouvel environnement stressant. Les résultats montrent qu'une population adaptée préalablement à un environnement stressant et fluctuant a une meilleure valeur sélective dans un nouvel environnement stressant, qu'une population adaptée à un seul stress. Nous voulions tenter d'aller plus loin sur les conséquences des adaptations aux régimes fluctuants, c'est pourquoi nous avons également étudié la mise en place de coûts adaptatifs lors d'une évolution dans un environnement fluctuant.

Nous pouvons voir à travers ces différents exemples, qu'il est devenu indispensable de considérer les effets évolutifs des polluants présents dans l'environnement pour une meilleure évaluation des risques écologiques (Coutellec & Barata, 2011).

## 1.2. Identifier les mécanismes évolutifs

### 1.2.1. Différencier les sources de variabilité

La valeur de variation la plus facilement mesurable est la variation phénotypique d'un trait dans une population. Pour obtenir une estimation de cette variation, il suffit de mesurer un trait sur plusieurs individus de la population et d'en calculer la variance. Même si la sélection se fait principalement sur cette variation phénotypique (Houle, 1992), la nature de cette variation affecte la réponse évolutive de la population pour ce trait. C'est pourquoi il est indispensable de comprendre les sources de variation phénotypique avant d'expliquer comment elles pourront être quantifiées.

La variabilité phénotypique exprimée d'un trait se décompose principalement en quatre effets : (i) génétiques ; (ii) environnementaux ; (iii) maternels ; et (iv) bruits développementaux (Lynch & Walsh, 1998). La part des effets génétiques additifs de la variance phénotypique d'un trait représente son héritabilité, l'autre part regroupe les effets environnementaux imputables aux variations des conditions du milieu de chaque individu (une partie de la variation phénotypique peut aussi être causée par des effets de dominance génétique). La plasticité phénotypique fait à la fois partie de la variabilité génétique et de la variabilité environnementale (voir les détails ci-dessous). Un effet maternel correspond à l'influence des facteurs environnementaux de la mère (qualité des soins maternels, carence alimentaire de la mère, polluant ingéré par la mère et transmis

au jeune, etc.) sur le phénotype de ses descendants. Ces effets sont aussi considérés comme de la plasticité phénotypique intergénérationnelle (Mousseau & Fox, 1998). La stabilité du développement correspond aux effets de mécanismes adaptatifs correcteurs qui permettent à un organisme de se développer de manière relativement stable en dépit des effets perturbateurs des bruits développementaux (Waddington, 1957 ; Hoffmann & Woods, 2001). Les bruits développementaux se révèlent par exemple par des différences phénotypiques entre deux clones provenant de la même ponte et vivant dans un environnement commun.

La plasticité phénotypique est la capacité d'un génotype à s'engager dans des trajectoires de développement différentes en fonction des conditions environnementales. Elle permet la production d'un ensemble de phénotypes à partir d'un seul génotype (Scheiner, 1993 ; Pigliucci, 2005). Cette plasticité associe une variance des traits à la variance environnementale. La notion de norme de réaction a été introduite après une étude morphologique chez des daphnies sous différents régimes de nutrition (Woltereck, 1909). Une norme de réaction est la réponse systématique de l'expression d'un trait phénotypique à une modification systématique d'une variable environnementale (de Jong, 1990). Cette notion permet, entre autres, la mise en évidence de plasticité du phénotype et d'interactions génotype-environnement ( $G \times E$  ; Figure 2).

Lorsque les normes de réaction de plusieurs génotypes sont parallèles, la variance génétique est indépendante de l'environnement et la plasticité phénotypique correspond uniquement à un effet environnemental. Lorsque les normes de réaction ne sont pas parallèles, la plasticité phénotypique a une base génétique. Ainsi la plasticité phénotypique peut elle-même être un trait héritable évoluant sous l'action de la sélection



naturelle. L'expression d'un gène est donc dépendante du milieu dans lequel il s'exprime (Lynch & Walsh, 1998).

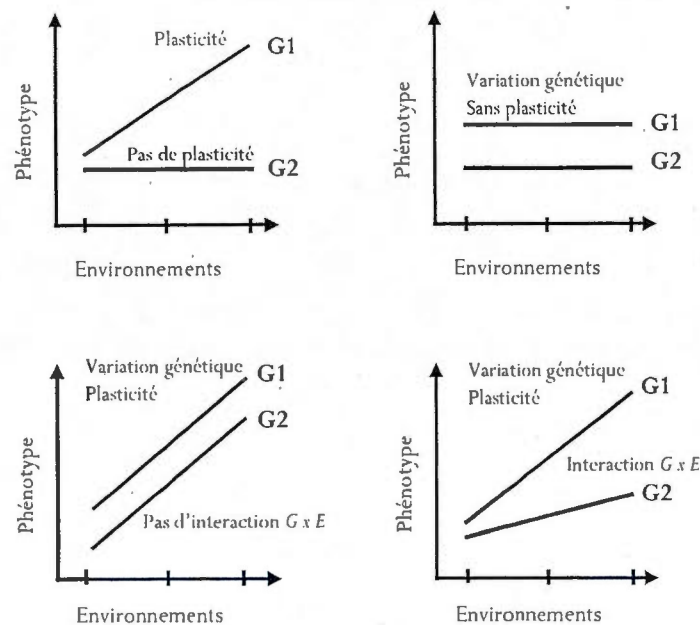


Figure 2. Sensibilité environnementale du phénotype.

Implications de la plasticité au travers des normes de réaction de deux génotypes (G1 et G2) sur un gradient environnemental. Lorsque la pente est non nulle, la norme de réaction montre de la plasticité. Ainsi, dans le graphique en haut à gauche, le génotype G1 est plastique (production de différents phénotypes dans différents environnements) contrairement au génotype G2 (production du même phénotype dans différents environnements). Lorsque les normes de réaction ont des ordonnées à l'origine différentes, il y a présence de variation génétique. Lorsque les normes de réaction ont des pentes différentes, les génotypes répondent différemment au gradient environnemental (présence d'interaction  $G \times E$ ) ; d'après Thomas *et al.* (2010).

Une variabilité génétique est très souvent associée à la plasticité des traits observés (Scheiner, 1993 ; Pigliucci, 1996). Ceci peut être mis en évidence grâce à deux types d'expériences (Figure 3). D'une part, des expériences de jardin commun (= common garden en anglais) qui sont réalisées sur des individus provenant de différentes populations soumises aux mêmes conditions environnementales. Une séparation est alors possible



entre la part due à la différenciation génétique de celle due à la réponse plastique de l'expression phénotypique (Miaud & Merilä, 2001). D'autre part, les expériences de transplantation réciproque, où les individus d'une population sont déplacés de leur site d'origine vers le site d'une autre population et inversement. Cette méthode apporte des informations sur l'aspect adaptatif de la plasticité (Hassel *et al.*, 2005 ; Iraeta *et al.*, 2006).

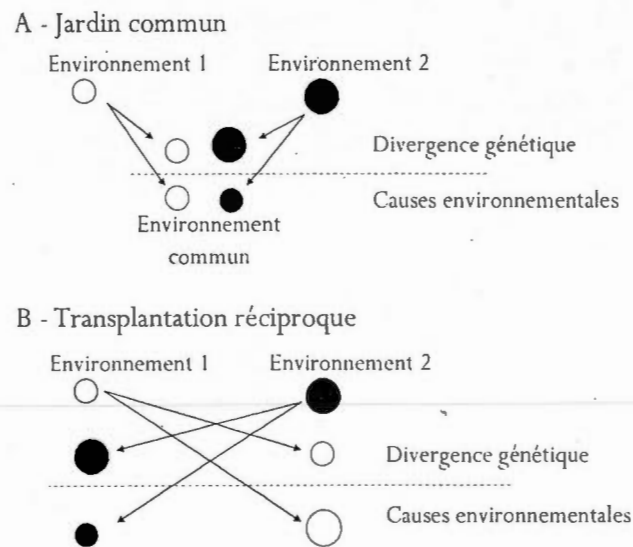


Figure 3. Représentation d'une expérience de « jardin commun » et de transplantation réciproque. La taille des cercles blancs et noirs représente la moyenne phénotypique des populations vivant respectivement dans les environnements 1 et 2. A l'extrémité des flèches, la taille des cercles indique la moyenne phénotypique des deux populations, une fois placées dans un nouvel environnement. Deux résultats possibles sont illustrés, le premier lorsque la différence initiale entre les populations est déterminée génétiquement, le deuxième lorsque la différence est uniquement due à l'environnement ; d'après Miaud & Merilä (2001).

L'analyse des différences phénotypiques entre les générations au cours d'une expérience d'évolution expérimentale permet de séparer certains de ces effets. Par exemple, dans une expérience d'évolution expérimentale, les changements phénotypiques observés entre la génération originelle et la première génération en contact avec le stress environnemental (en comparaison avec un contrôle) révèlent des effets de plasticité

phénotypique et des effets de sélection intragénérationnelle (Tableau 2). L'étude sur plusieurs générations et la réalisation d'expériences de jardin commun ou de transplantation réciproque permettent donc d'isoler les changements génétiques dus à la sélection uniquement, ce que nous avons réalisé dans notre étude.

Tableau 2. Mécanismes impliqués dans les différences phénotypiques.

Mécanismes observées entre les groupes (contrôles et stressés) au sein de la même génération, et pour un même groupe, à travers les générations ; d'après Kawecki *et al.* (2012).

| Différences phénotypiques entre groupes | Mécanismes impliquées  |
|---|--|
| Entre contrôles et stressés à P0        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasticité phénotypique développementale</li> <li>- Sélection direct par la mortalité</li> </ul>  |
| Entre P0 et F1                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Changements génétiques dus à la sélection</li> <li>- Effets maternels</li> <li>- Mutations et dérive génétique (ici, considérées négligeables)</li> <li>- Changements environnementaux incontrôlés entre générations (visible chez le groupe contrôle, s'il existe)</li> </ul>  |
| Entre F1 et F2                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Changements génétiques dus à la sélection</li> <li>- Effets grandmaternels (effets maternels différentiels de P0 sur F1 affectant les performances de la mère F1)</li> <li>- Mutations et dérive génétique (ici, considérées négligeables)</li> <li>- Changements environnementaux incontrôlés entre générations</li> </ul> |
| Entre F2 et générations suivantes       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Changements génétiques dus à la sélection</li> <li>- Mutations et dérive génétique (ici, considérées négligeables)</li> <li>- Changements environnementaux incontrôlés entre générations</li> </ul>   |

$\Delta_1 = P0_C - P0_T = \text{plasticité} + \text{sélection}$  ;  $\Delta_2 = F1_C - F1_T = \text{plasticité} + \text{sélection} + \text{effets maternels} + \text{réponse évolutive}$  ;  $\Delta_3 = F2_C - F2_T = \text{plasticité} + \text{sélection} + \text{effets maternels (et grand-maternels)} + 2 \times \text{réponse évolutive}$ , où  $P0_C$ ,  $F1_C$ ,  $F2_C$  correspondent aux mesures faites sur la population contrôle à la même génération que pour les populations traitées ( $P0_T$ ,  $F1_T$ ,  $F2_T$ ). On a donc si on considère les effets grand-maternels négligeables :  $\Delta_3 - \Delta_2 = \text{réponse évolutive}$  ;  $\Delta_2 - \Delta_1 = \text{réponse évolutive} + \text{effets maternels}$ .

### 1.2.2. Action sur les traits d'histoire de vie et les comportements

Parce qu'ils sont facilement mesurables et du fait de leur lien étroit avec la valeur sélective et la démographie d'une population (Falconer & Mackay, 1996 ; Roff, 2002b), les traits d'histoire de vie font souvent l'objet d'études en évolution expérimentale. Pour ces raisons, nous avons suivi plusieurs de ces traits dans nos expériences.

Deux hypothèses sont généralement prises en compte dans toute étude en évolution contemporaine des traits d'histoire de vie. Premièrement, le niveau de variabilité génétique des traits d'histoire de vie et donc leur héritabilité et leur potentiel évolutif sont supposés être plus faibles que ceux des traits moins étroitement liés à la valeur sélective (traits morphologiques, comportementaux ou physiologiques ; Mousseau & Roff, 1987). Il n'existe pas de prédiction simple sur un fort niveau d'héritabilité pour les traits d'histoire de vie car de nombreux patrons de transmission de ces traits existent, incluant notamment l'interaction  $G \times E$  (Price & Schluter, 1991). Toutefois, cette faible héritabilité peut être due à une forte variabilité environnementale et non pas à une réduction, par rapport aux autres traits, de la variance génétique additive (Charmantier & Garant, 2005). Deuxièmement, il est supposé que l'évolution des traits d'histoire de vie dépend étroitement de leur implication dans des compromis évolutifs et génétiques (Roff, 2002b). Nous pouvons notamment citer le coût de maintenance, pour certains traits d'histoire de vie, d'une forte plasticité phénotypique (DeWitt *et al.*, 1998).

Les stress commencent à perturber les comportements des organismes à des niveaux inférieurs de ceux des traits d'histoire de vie. Cela peut avoir des répercussions sur la valeur sélective des individus et *in fine* sur la dynamique de la population (Døving, 1991 ; Scott & Sloman, 2004 ; Faucher *et al.*, 2008). Par exemple, en observant le

comportement, il est possible de détecter des effets à des niveaux plus faibles de pollution qu'avec des observations physiologiques.

### 1.3. Modéliser l'évolution

Lorsque la biologie évolutive a cherché à intégrer la génétique mendélienne, ses concepts ont dû être clarifiés grâce à des outils mathématiques. La formalisation mathématique de modèle simple est une manière efficace de communiquer des idées. Il faut cependant souligner que les résultats dépendent toujours des hypothèses qui sont faites lors de la construction du modèle. Selon Thomas *et al.* (2010), il existe trois approches principales de modélisation en écologie évolutive : (i) la génétique des populations, qui étudie la transmission des traits et le lien entre génotype et phénotype, en négligeant la démographie des populations ; (ii) la dynamique adaptative, centrée sur le phénotype qui considère les interactions écologiques entre individus haploïdes, suivant des modèles démographiques, et met de côté la transmission d'un trait par plusieurs gènes ; (iii) la génétique quantitative, où l'étude de la variabilité génétique, de l'héritabilité et des gradients de sélection est indispensable, car les traits soumis à la sélection sont déterminés par plusieurs gènes.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons choisi d'appliquer des méthodes tirées de la génétique quantitative. Les équations de base de génétique quantitative ont été d'un grand soutien pour tenter d'expliquer ce que nous avons observé dans nos expériences sur les mécanismes évolutifs. Nous allons maintenant détailler et expliquer pourquoi nous avons retenu comme approche la génétique quantitative.

### 1.3.1. Introduction

La génétique quantitative voit le jour avec des biométriciens tels que Bateson, Pearson, Galton à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Ces scientifiques ont mis l'accent sur le fait que la distribution continue des traits s'opposait aux théories génétiques de Mendel (Falconer & Mackay, 1996). Ils jugeaient incompatibles ces modèles avec la variation héréditaire des traits à variation continue et donc, avec la théorie darwinienne de l'évolution graduelle. La grande difficulté de la génétique quantitative est de modéliser la transmission des traits et d'intégrer une variabilité environnementale et génétique pour chacun d'eux. En revanche, cette méthode a l'avantage de mesurer les grandeurs macroscopiques, telles que la variance d'un trait, plus facilement que celles microscopiques. Cela fait de cette discipline un outil de choix lorsque l'on cherche à produire de l'évolution expérimentalement, comme l'adaptation d'une population à un polluant (Coutellec & Barata, 2011 ; Klerks *et al.*, 2011).

Le modèle infinitésimal de Fisher (1918) a permis d'établir une cohérence entre la génétique quantitative et les lois de Mendel. Ce modèle s'applique à la covariance entre les individus apparentés issus d'une reproduction sexuée ; la ressemblance entre ces individus est la conséquence du partage d'allèles en commun. Selon ce modèle, la variation pour les traits quantitatifs résulte de l'action combinée d'un grand nombre (infini) de gènes à hérédité mendélienne individuelle. Chacun de ces loci a un effet individuel négligeable (Fisher, 1930 ; Lynch & Walsh, 1998). Ce modèle est une bonne base à la compréhension génétique de la variation quantitative au niveau phénotypique. Il a même déjà pu être validé grâce à un modèle de génétique quantitative, couplé aux analyses microsatellites et basé sur des données recueillies dans une petite population naturelle de poisson (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) à travers une échelle de temps courte (Koskinen *et al.*, 2002). Les auteurs ont démontré que la sélection était le

mécanisme de diversification dominant pendant les premiers stades de l'évolution des traits d'histoire de vie de cette espèce. Le pouvoir de la sélection naturelle fut extrêmement important car les populations originelles étaient composées d'un petit nombre de fondateurs. Ces populations montrent aussi une petite taille efficace et des empreintes génétiques d'un goulot d'étranglement, qui sont conditions favorables à l'influence de la dérive génétique.

### 1.3.2. Décomposer la variation phénotypique

Pour chacun de ses traits, un individu a une valeur phénotypique. Cette valeur doit être considérée par rapport à la moyenne des valeurs dans la population ( $\bar{x}$ ). Sa valeur relative ( $x_i$ ) détermine le rôle que peut jouer un individu dans la sélection. L'écart à la moyenne est  $P = x_i - \bar{x}$ . Cet écart a deux composantes : l'influence relative des gènes ( $G$ ) et de l'environnement ( $E$ ). Cette décomposition du phénotype est le principe fondamental de la génétique quantitative. En l'absence de corrélation entre  $G$  et  $E$  (absence supposée par le modèle) on obtient  $P = G + E$ . La variance phénotypique ( $V_P$ ) quant à elle est dépendante d'effets génétiques ( $V_G$ ), environnementaux ( $V_E$ ) et de leurs interactions ( $V_{G \times E}$ ) :

$$V_P = V_G + V_E + V_{G \times E}$$

de la même manière, la variance génétique peut être décomposée en trois : la variance additive ( $V_A$ ) correspondant à la somme des effets moyens des allèles agissant sur le trait observé, la variance due à la dominance entre les allèles ( $V_D$ ) et la variance due à l'épistasie entre les allèles des différents loci ( $V_I$ ). Elle se formule ainsi (Falconer & Mackay, 1996 ; Lynch & Walsh, 1998) :

$$V_G = V_A + V_D + V_I.$$

Après la décomposition phénotypique, la seconde équation primordiale en génétique quantitative (permettant d'obtenir l'héritabilité) est l'équation de l'éleveur (= breeder's equation en anglais) :

$$R = h^2 S,$$

où  $R$  est la réponse à la sélection et  $S$  le différentiel de sélection et  $h^2$  l'héritabilité. Cette équation est recommandée lors d'expérience de sélection artificielle sur un trait ou un ensemble de traits car  $S$  est contrôlable. Il est d'ailleurs important de noter, que dans le cas où cette équation fait intervenir plusieurs traits, il faut alors tenir compte des corrélations génétiques entre eux (Falconer & Mackay, 1996 ; Lynch & Walsh, 1998). Ce que nous avons appliqué dans ce travail (voir article II),

Une seconde équation peut également être utilisée. C'est l'identité de Robertson-Price, aussi appelée second théorème de la sélection naturelle :

$$\Delta z = \sigma_a(z, w),$$

où  $\Delta z$  est le changement attendu entre les générations pour le phénotype moyen  $z$ ,  $w$  est la valeur sélective relative et  $\sigma_a(w, z)$  représente la covariance génétique additive entre  $z$  et  $w$  (Price, 1970). Morrissey *et al.* (2010) ont synthétisé l'intérêt des deux équations selon les applications. Même si  $R$  et  $\Delta z$  ont un sens commun, il existe une différence



majeure entre ces deux équations. L'équation de l'éleveur suggère qu'il est possible de mesurer la relation entre un trait et sa valeur sélective (sélection) et entre un trait et des gènes (héritabilité) séparément. Cette équation permet donc de reconstituer la façon dont des ensembles finis de traits peuvent évoluer, mais aussi être potentiellement corrélés entre eux et faire évoluer la vitesse de variation de la valeur sélective. L'identité de Robertson-Price, quant à elle, n'a qu'un terme, exigeant ainsi de considérer conjointement la variation de la valeur sélective et les gènes codant pour un trait afin de prédire l'évolution. Or, la compréhension de l'influence d'un trait sur la valeur sélective et la façon dont leur évolution affecte le phénotype sont complémentaires (Kruuk *et al.*, 2003). La cause directe des changements microévolutifs est la relation entre la valeur sélective et les variations génétiques, indifféremment de la manière dont cette relation intervient. Toutefois, ceci est problématique, en particulier, pour l'étude des microévolutions dans les populations naturelles. En effet, ces microévolutions se produisent plus difficilement. Une stase, ou même des tendances phénotypiques contraires à l'intuition sont aussi fréquentes que des changements compatibles avec l'équation de l'éleveur (Merilä *et al.*, 2001 ; Wilson *et al.*, 2007). Cependant les deux méthodes ont des lacunes pour prédire l'évolution. En effet, l'hypothèse derrière les analyses de sélection concerne le lien entre la valeur sélective et le trait d'intérêt (Kruuk *et al.*, 2003). Une variable de l'environnement, comme la qualité des ressources, peut notamment influencer sur la valeur du trait, mais aussi et indépendamment, avoir un effet sur la valeur sélective. Stinchcombe *et al.* (2002) proposent un exemple hypothétique chez une population de plante. La teneur en azote du sol détermine la concentration en alcaloïdes défensifs, ainsi que le taux de croissance de la plante, donc sa valeur sélective. Par conséquent, une corrélation positive existe entre la concentration en alcaloïdes et la valeur sélective, bien que ces alcaloïdes ne confèrent aucun avantage sélectif. Dans ce cas, la corrélation générerait un gradient de sélection positif. Si le trait est héritable,

l'existence d'un potentiel évolutif serait prédite alors que les différences de valeur sélective ne sont associées qu'à la composante (variance et covariance) environnementale du trait. Toutefois, l'équation de l'éleveur a eu plus de succès dans la prédiction des changements évolutifs dans les expériences en laboratoire que sur le terrain. De nombreuses estimations quantitatives de la sélection directionnelle et d'héritabilité ont été réalisées en laboratoire pour des traits ayant une importance écologique (Mousseau & Roff, 1987 ; Kingsolver *et al.*, 2001). En général, ces traits sont bien sous sélection directionnelle et la variation de ces traits a une base génétique, en particulier les traits d'histoire de vie. Nous nous sommes donc limités à l'utilisation de l'équation de l'éleveur dans notre étude.

Au sens large, l'héritabilité ( $H^2$ ) est la proportion de  $V_P$  d'une population qui sera transmise à la génération suivante. C'est une évaluation relative de la variation génétique présente, incluant des effets de dominance et d'épistasie. Elle mesure les contributions relatives des différences génétiques et environnementales dans la  $V_P$  totale :  $H^2 = V_G / V_P$ . Cependant puisque seule la variance additive permet la réponse à la sélection, au sens strict, l'héritabilité ( $h^2$ ) est une évaluation relative de  $V_A$ , transmissible et accessible à la sélection naturelle ou artificielle. On peut l'écrire ainsi :

$$h^2 = \frac{V_A}{V_P} = \frac{V_A}{V_A + V_D + V_I + V_E}.$$

L'héritabilité fluctue donc dans le temps en fonction des changements environnementaux, de l'effet de la sélection ou par exemple de la diversité génétique de la population. L'héritabilité est l'une des propriétés les plus importantes d'un trait quantitatif en génétique quantitative (Falconer & Mackay, 1996). Elle a été de

nombreuses fois estimée par la méthode des régressions parent-enfant (Falconer & Mackay, 1996 ; Lynch & Walsh, 1998). Cependant ce type d'approche pose plusieurs problèmes. Si les mesures sont faites au même âge, le temps correspondant à la génération séparant parents et enfants peut biaiser les mesures effectuées. De plus, il est difficile de s'affranchir de l'influence d'effets maternels susceptibles de brouiller la mesure de l'héritabilité des traits (Lynch & Walsh, 1998). D'autres méthodes sont ainsi préférées comme l'application du maximum de vraisemblance (Lynch & Walsh, 1998) ou du maximum de vraisemblance restreint : « le modèle animal » (Kruuk, 2004). Ces méthodes permettent de prendre en compte tous les liens de parenté entre individus d'une population et de traiter efficacement la complexité des données recueillies en milieu naturel (Charmantier & Garant, 2005).

Même si d'autres méthodes existent encore, nous nous focalisons dès à présent sur la technique des lignées iso-femelles, pour plusieurs raisons, que nous détaillerons après avoir donné un aperçu de cette technique. Elle consiste à isoler des femelles dans des répliquats d'élevage différents afin d'obtenir des fratries (David *et al.*, 2005). Lorsque l'on utilise la technique des lignées iso-femelles, il est impératif d'éviter : (i) l'insémination d'une femelle (ou un hermaphrodite) par plusieurs mâles, fréquent chez les drosophiles (comme chez *C. elegans*) et (ii) la mesure répétée pour des traits sur des individus de la même lignée. Ainsi, il s'agit alors de séparer et de croiser une femelle d'une lignée avec un mâle d'une lignée indépendante pour générer une nouvelle lignée (David *et al.*, 2005). Elle permet ainsi d'estimer la corrélation génétique entre des traits dans une population grâce à l'observation des valeurs phénotypiques intra- et interlignées iso-femelles. Il est donc plus simple de quantifier l'interaction  $G \times E$ , en particulier chez les populations naturelles (Parsons & Hosgood, 1967). De plus, la technique donne une bonne approximation de l'héritabilité au sens strict (Hoffmann & Parsons, 1988) et est

régulièrement utilisée pour analyser les traits quantitatifs de populations (Hoffmann & Merilä, 1999 ; David *et al.*, 2005 ; Fanara *et al.*, 2006). Cette méthode a été retenue dans notre étude pour toutes ces raisons. Une particularité supplémentaire s'ajoute à cela, grâce au système de reproduction de notre organisme modèle, *C. elegans*. En effet, il est possible de créer des lignées, mais avec des hermaphrodites (voir la partie « 2.2.2 Reproduction »). Ainsi, nous préférons désormais utiliser le terme lignée isogénique (même génotype) dans notre étude plutôt que lignée iso-femelle (voir l'article II). Une fois les lignées créées, elles ne nécessitent plus de mâles pour obtenir les générations suivantes. Les lignées de *C. elegans* conserveront donc une héritabilité plus stable au fil des générations que chez d'autres espèces comme *D. melanogaster* (Hoffmann & Parsons, 1988). De plus, l'utilisation de méthode utilisant les liens de parenté, comme le « modèle animal » serait très difficile à mettre en place pour une espèce de petite taille où la différenciation entre individus ne peut se faire qu'en les séparant, ce qui est fait dans la méthode des lignées isogéniques, que nous avons utilisée.

### 1.3.3. Étudier les sources de la différenciation entre populations

Les expériences de type jardin commun ou de transplantation réciproque permettent de vérifier si la différenciation entre deux populations est d'ordre génétique ou environnementale (Lynch & Walsh, 1998). Il est alors possible d'introduire un autre paramètre, le gradient de sélection ( $\beta$ ) :

$$R = \frac{V_A}{V_P} S = V_A \beta.$$

L'extension de cette équation à plusieurs traits (multivariée) doit tenir compte de la covariance génétique ( $Cov$ ) entre ces traits (ici, X et Y).

$$R_X = V_A(X)\beta(X) + Cov(X,Y)\beta(Y),$$

plus généralement  $R = G\beta$  où  $R$  est le vecteur d'évolution,  $\beta$  le vecteur gradient de sélection et  $G$  la matrice de variance-covariance génétique (Figure 4 ; Lande, 1979 ; Lande & Arnold, 1983). La matrice de variance-covariance génétique (ou matrice  $G$ ) est une matrice caractérisant les associations linéaires (covariances génétiques) entre les différents traits d'une population dues à des effets génétiques communs. Il est à noter que l'héritabilité n'est qu'une pondération de la variance additive génétique par la variation phénotypique, de même qu'une corrélation génétique ( $r_G$ ) entre deux traits correspond à la covariance génétique entre ces traits pondérée par la variance génétique additive de chaque trait :

$$Cov(X,Y) = r_G \sqrt{V_A(X)V_A(Y)},$$

la matrice  $G$  est donc en quelque sorte une représentation d'une matrice des héritabilités et des corrélations génétiques entre les traits.

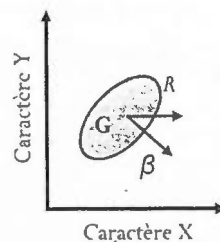


Figure 4. Représentation graphique de la matrice de variance-covariance ( $G$ ) entre deux traits (X et Y). La matrice est influencée par le vecteur évolution ( $R$ ) et le vecteur gradient de sélection ( $\beta$ ).

Un exemple de modèle d'évolution formalisé en génétique quantitative est le « runaway » de Fisher (1930). Ce modèle traite de l'évolution d'un trait qui n'est pas directement lié à la valeur sélective et basé sur un mécanisme d'emballement par rétroaction positive. En effet, c'est une sélection sexuelle par une coévolution entre un ornement chez le mâle (caractère sexuel secondaire) et la préférence de la femelle pour cet ornement. Lande (1981) a clarifié, grâce à un modèle continu, le mécanisme de Fisher de spéciation rapide par la sélection sexuelle :

$$\begin{pmatrix} \Delta \bar{T} \\ \Delta \bar{P} \end{pmatrix} = G \begin{pmatrix} \beta(T) \\ \beta(P) \end{pmatrix}$$

où  $\Delta \bar{T}$  et  $\Delta \bar{P}$  sont les changements respectifs de la moyenne du trait chez le mâle et de la préférence chez la femelle ;  $G$  est la matrice de variance-covariance génétique de  $T$  et  $P$  ;  $\beta(T)$  et  $\beta(P)$  sont les gradients de sélection de  $T$  et  $P$ . La corrélation est générée par la sélection dans ce système. En effet, s'il existe de la variation de préférence entre femelles pour le trait dans la population et que ce trait est sous sélection, la population tend vers une corrélation de ces deux traits.

La démarche typique d'un modèle de génétique quantitative consiste donc à exprimer simplement les gradients de sélection, puis éventuellement supposer la matrice  $G$  constante, et enfin à annuler le gradient de sélection pour trouver, s'il y en a, des équilibres. Cependant, dans la nature, la matrice  $G$  n'est pas une constante puisqu'elle résulte d'un processus de mutation, de sélection, de dérive génétique et de recombinaison. Son degré de variation dans la nature, concernant les macroévolutions, reste d'ailleurs largement inconnu (Steppan *et al.*, 2002). Néanmoins, la matrice  $G$  est utile pour prédire les changements évolutifs plus facilement atteignables (Roff, 2000 ;



Charmantier *et al.*, 2008). Elle dévie la réponse à la sélection vers ces combinaisons de valeurs de traits qui ont plus de variations génétiques. Par conséquent, elle ralentit ou accélère la vitesse à laquelle un nouvel état peut être atteint pour certains traits, en comparaison d'une situation où ces traits seraient indépendants (Steppan *et al.*, 2002). Ainsi, une estimation de la matrice **G** est nécessaire à l'estimation du potentiel évolutif d'une population (Cheverud, 1984 ; Roff, 2002b).

Il faut donc savoir, et nous donnerons plus de détails dans les articles 2 et 3, que si cette matrice change en fonction des conditions environnementales et au cours du temps, la réponse évolutive des traits n'est plus prédictible par l'équation multivariée de l'éleveur. Or, il a déjà été démontré que cette matrice n'était pas obligatoirement stable à travers le temps (Figure 5; Steppan *et al.*, 2002 ; McGuigan, 2006 ; Doroszuk *et al.*, 2008), même sur quelques dizaines de générations (Sgrò & Blows, 2004). De plus, les changements dans les conditions environnementales peuvent affecter la variance génétique additive et environnementale des traits (Hoffmann & Merilä, 1999 ; Charmantier & Garant, 2005) ainsi que leur covariance (Sgrò & Hoffmann, 2004).

Ainsi, grâce à nos expériences liées au concept de génétique quantitative nous avons eu la possibilité de vérifier si le développement dans un milieu pollué entraîne un changement brusque dans la structure génétique des traits d'histoire de vie de *C. elegans*. De plus nous avons examiné si la matrice de variance covariance phénotypique (matrice **P**) pouvait nous permettre d'identifier des changements de la matrice **G** (article III).

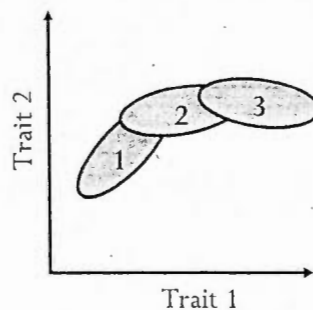


Figure 5. Matrice  $G$  entre deux traits.

Les numéros correspondent à des périodes successives (1, 2 et 3) au cours desquelles la matrice  $G$  change de structure, à cause d'un changement d'environnement au début de la période 1.

## 2. Matériel

### 2.1. Stress environnementaux d'intérêts

De manière synthétique, un polluant est un altérage biologique, physique ou chimique, qui engendre des effets négatifs sur tout ou une partie d'un écosystème. Ainsi, alors que le contaminant se définit comme toute substance décelée dans un lieu où il ne se trouve pas normalement, le polluant quant à lui, est un contaminant ayant un effet sur l'écosystème. Nous présentons ci-dessous les polluants que nous avons retenus dans le cadre de ce travail mais nous donnons plus de détails sur les effets spécifiques de l'uranium et du sel sur *C. elegans* dans les chapitres qui suivent (c'est-à-dire les articles).

#### 2.1.1. Uranium

L'uranium (U) est un métal lourd naturel radioactif, omniprésent dans l'environnement. L'uranium naturel est extrait sous forme de minerai composé à 99,275% de l'isotope 238, à 0,719% de l'isotope 235 et à 0,0057% de l'isotope 234 (Colle *et al.*, 2001). Henri



Becquerel découvre en 1896 que des sels d'uranium sont capables de noircir les plaques photographiques grâce à l'émission de rayonnements (Genet, 1995). Cette découverte marque le début de l'histoire de l'utilisation de la radioactivité. Après la découverte de sa fission, l'uranium est très vite devenu un élément important pour l'activité humaine. Il est d'abord utilisé dans la fabrication de bombes nucléaires comme celle d'Hiroshima, puis dans la production d'énergie électrique. En 2009, 28% de la production d'énergie primaire en Europe était d'origine nucléaire et avec 78% de sa production d'électricité, la France en a fait sa source majeure de production d'énergie électrique (Bosch *et al.*, 2009).

Certaines activités anthropiques (essais militaires, rejets accidentels, fonctionnement normal des installations nucléaires, etc.) sont responsables de l'augmentation de la concentration en uranium dans certains écosystèmes aquatiques et terrestres (Hart *et al.*, 1986 ; Lozano *et al.*, 2000 ; UNSCEAR, 2000 ; Lottermoser *et al.*, 2005 ; Jurgens *et al.*, 2010 ; Uralbekov *et al.*, 2011). Les organismes inféodés à ces écosystèmes peuvent subir les effets toxiques de l'uranium (Colle *et al.*, 2001). Cependant, les données sont peu nombreuses, en particulier pour les organismes des écosystèmes terrestres. Il existe quelques résultats concernant des invertébrés du sol, tels que des arthropodes et des annélides (Sheppard *et al.*, 2005). En tant que métal lourd, ce polluant présente une forte toxicité chimique pour les organismes (Miller *et al.*, 2002 ; Mathews *et al.*, 2009). On considère en revanche que sa radiotoxicité externe est beaucoup moins importante, à cause de sa faible activité (activité spécifique de  $2,53 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1} \text{ U}$ ) et sa faible pénétration des particules  $\alpha$  dont l'uranium est majoritairement composé (Thomas & Liber, 2001 ; Kuhne *et al.*, 2002).

### 2.1.2. Sel

Le stress salin que nous avons étudié à travers l'utilisation de forte concentration en chlorure de sodium (NaCl) est l'un des minéraux les plus abondants dans l'environnement, notamment dans les océans. Il est en outre composé d'éléments indispensable à la vie, contrairement à l'uranium.

Plusieurs activités humaines entraînent cependant une augmentation des concentrations en NaCl dans certains écosystèmes terrestres et aquatiques. En effet, un certain nombre d'écosystèmes voient leur quantité d'eau diminuer entraînant l'augmentation de leurs concentrations en sels à cause de l'augmentation des températures moyennes (Tabeaud & Simon, 1996). De plus, dans certaines régions du monde, lorsque les conditions climatiques affectent le trafic routier, les routes verglacées et enneigées sont salées avec principalement du NaCl (Charbonneau, 2006). Ce sel peut se retrouver dans les écosystèmes aquatiques – de surface ou souterrains – ce qui peut alors affecter les organismes qui y vivent (Denoël *et al.*, 2010). Enfin, l'irrigation intensive de certaines terres cultivées est aussi une cause importante de l'augmentation en sel dans l'environnement et en particulier dans des sols (Rengasamy, 2006 ; Verwey & Vermeulen, 2011). La pollution au sel requiert donc d'être très sérieusement étudiée dans les années à venir.

### 2.1.3. Augmentation de la température

Même si ce n'est pas une pollution, nous voulions également introduire le stress lié à l'augmentation de la température, en tant que nouvelle contrainte pour estimer les coûts adaptatifs (article IV). Nous avons choisi ce stress environnemental car il est lié au

réchauffement climatique global de la planète. D'après le Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC ou IPCC en anglais), la température à la surface de la Terre a augmenté en moyenne d'1°C depuis un siècle. Mais ce réchauffement s'est fortement accéléré au cours des cinquante dernières années (IPCC, 2007). En 2007, onze des douze dernières années figuraient au palmarès des douze années les plus chaudes depuis 1850. C'est pourquoi on s'attend à de graves conséquences sur les écosystèmes. D'ailleurs, nous pouvons citer certains phénomènes météorologiques extrêmes qui vont s'aggraver, tels que les canicules ou les sécheresses. Or nous savons aujourd'hui que si la température augmente de plus de 2.5°C, une extinction 20 à 30% des espèces animales et végétales est possible. C'est donc un risque pour toutes les populations naturelles.

## 2.2. Modèle biologique

### 2.2.1. Écologie

*C. elegans* fait partie du règne des Métazoaires, de l'embranchement des Nématodes (Classe : Secernentea, Ordre : Rhabditida, Famille : Rhabditidae). *C. elegans* a été découvert pour la première fois dans des échantillons d'humus provenant d'Algérie (Maupas, 1900). Il est possible de retrouver des populations de *C. elegans* sur la quasi-totalité de notre planète en : Afrique, Amérique du Nord, Europe, Asie, Australie et aussi bien dans des zones froides (Québec, Canada), très chaudes et sèches (Californie, États-Unis) ou isolées (Hawaii, Madère). Cet organisme bactériophage non-parasitaire, vit librement dans les sols mais peut aussi former une association phorétique avec certains arthropodes isopodes ou diplopodes (mille-pattes) et des mollusques gastéropodes (escargots, limaces) (Barrière & Félix, 2005b ; Kiontke & Sudhaus, 2006). Lors de la découverte de ces populations naturelles, les individus étaient généralement au stade de

résistance : dauer (Barrière & Félix, 2005a). Ce stade particulier sera expliqué ci-après. En revanche, une très grande partie des populations associées à de la matière végétale en décomposition (fruit, compost) ne sont pas au stade dauer (Barrière & Félix, 2005b ; Hodgkin & Partridge, 2008).

#### 2.2.2. Reproduction

Son système de reproduction est l'androdioécie, c'est-à-dire que les individus sont soit des hermaphrodites XX, soit des mâles XO. La présence de mâles est facultative dans une population car les hermaphrodites peuvent se reproduire par autofécondation. De plus, la fécondation croisée n'est possible qu'entre un hermaphrodite et un mâle. Un hermaphrodite pond au maximum 300 embryons. Ce nombre est limité par la quantité de sperme produit avant les ovocytes. En revanche, cette limitation affecte plutôt la production d'ovocytes en cas de restriction calorique, la taille de ponte est alors plus petite (Goranson *et al.*, 2005). Les tailles de ponte sont bien plus élevées en présence de mâles : deux à quatre fois plus d'embryons dans la population (LaMunyon & Ward, 1995 ; 1998). La présence de mâles dépend du taux de production spontanée par non-disjonction du chromosome X à la méiose et de leur efficacité à féconder les hermaphrodites (Barrière & Félix, 2005b). Au laboratoire la non-disjonction spontanée du chromosome X se produit à un faible taux (1 ‰) mais peut varier lors d'altérations des conditions environnementales comme l'augmentation de la température (Nigon & Dougherty, 1949). Il est possible de distinguer morphologiquement les mâles (Figure 6A) et les hermaphrodites (Figure 6B). En effet, les mâles possèdent un appareil copulateur à l'extrémité arrière (Sulston *et al.*, 1980).

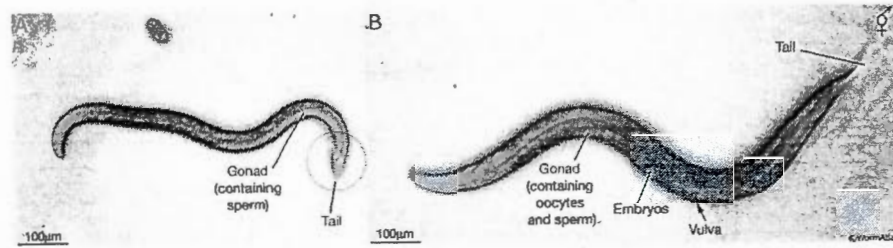


Figure 6. Photographie d'un mâle (A) et d'un hermaphrodite (B) chez *C. elegans*.

Modifiée d'après le site Wormatlas : <http://www.wormatlas.org/male/introduction/Introframeset.html>.

### 2.2.3. Forme de résistance

Lorsque les conditions de vie sont trop sévères, par exemple une température trop élevée ( $\sim 27^{\circ}\text{C}$ ) ou un manque de nourriture, le stade larvaire dauer est induit. Il existe aussi une phéromone permettant le passage vers cette forme de résistance, lorsque la densité dépendance est trop importante. En effet, la phéromone est alors en quantité suffisante pour induire ce changement dans le cycle de vie. De plus, si elle est couplée à une température stressante, l'induction en dauer sera renforcée (Golden & Riddle, 1984). Cette larve est capable de vivre six mois et peut migrer sur de plus longues distances qu'un adulte hermaphrodite. Les larves ont la possibilité de passer par ce stade après le stade L1 en passant d'abord au stade L2d (pré-dauer). Ils reprennent ensuite leur cycle de vie à partir du stade larvaire L4 (Figure 7), lorsque les conditions du milieu sont plus favorables (Cassada & Russell, 1975 ; Ailion & Thomas, 2000).



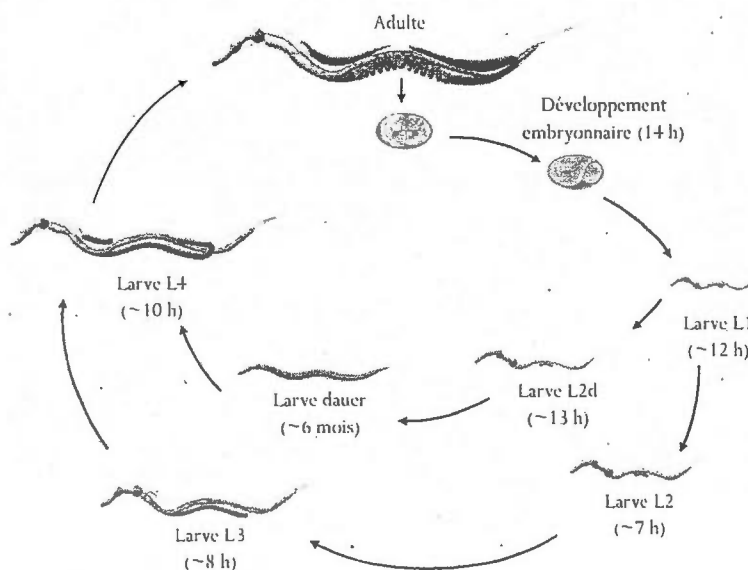


Figure 7: Cycle de vie de *C. elegans* à 20°C.

La durée de chacun des stades (la fertilisation correspond au temps  $t = 0$  min) est indiquée entre parenthèses ; modifiée d'après le site WormAtlas : <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>.

#### 2.2.4. Un animal modèle de laboratoire

À 20°C, la température de référence (Byerly *et al.*, 1976), la taille adulte de *C. elegans* est d'1,1 mm, sa longévité est d'environ 21 jours, sa fécondité (lors d'une autofécondation exclusive) est de 180 à 300 embryons par individu et son cycle de vie est de trois jours (Figure 7). De ce fait, ce modèle animal, nous offre dans le domaine de la biologie évolutive expérimentale la possibilité de travailler sur un grand nombre d'individus et de générations (Braendle *et al.*, 2008), sous une loupe binoculaire (Figure 8).

Les connaissances acquises sur *C. elegans* depuis des décennies (Nigon & Dougherty, 1949 ; Brenner, 1974) allant de sa physiologie (organisme eutélique de 959 cellules chez l'hermaphrodite), à son génome totalement séquencé (100 millions de paires de bases sur

ces six chromosomes) en font un organisme de référence pour mener des expériences à différentes échelles, du moléculaire à la réponse phénotypique (Félix, 1997 ; Araiz *et al.*, 2008).

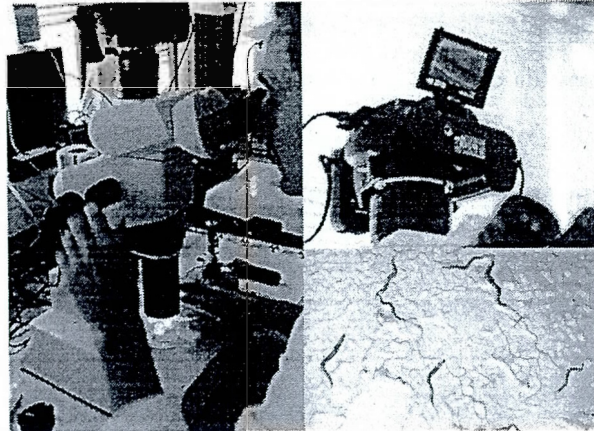


Figure 8. Observation de *C. elegans* sous une loupe binoculaire.

Les individus se déplacent sur leur milieu de culture et se nourrissent de bactéries *E. coli* ; © J-M Bonzom/IRSN.

#### 2.2.5. La souche N2

La souche de référence en laboratoire, de type sauvage (N2), fut isolée de l'humus utilisé pour une culture de champignon au Royaume-Uni (Staniland, 1957). Elle est la plus communément utilisée en écotoxicologie (Dhawan *et al.*, 2000 ; Anderson *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2009) et est récemment devenu une référence en biologie évolutive (Braendle *et al.*, 2008 ; Morran *et al.*, 2009). Pour ces raisons, nous nous sommes focalisés d'abord sur cette souche pour réaliser nos premières expériences (article I). Toutefois, la souche N2 a une diversité génétique extrêmement faible du fait de sa culture en laboratoire depuis plus de 50 ans et n'est pas adaptée dans le cadre de nos expériences. Henrique Teotónio, chercheur à l'Institut Gulbenkian de Sciences (Portugal) a construit une population à partir de croisements par paire de 16 isolats sauvages (probablement 13



haplotypes d'après Teotónio). Cette population possède une grande diversité génétique grâce à une dynamique de population caractérisée par un taux constant de 50 % de fécondation croisée. Elle se trouve dans des conditions de laboratoire bien définies depuis 140 générations. À partir la génération 0, l'équilibre recombinaison-sélection a été réalisé sans perte significative de la diversité génétique. De plus, malgré la recombinaison des souches, la structure de déséquilibre de liaison suit ce qui est connu de *C. elegans* à l'état sauvage (Kawecki *et al.*, 2012 ; Teotónio *et al.*, 2012). Henrique Teotónio nous a gracieusement fournie cette population afin de réaliser nos expériences (article II à IV). Dans l'annexe A, nous présentons la comparaison des effets de l'uranium sur la population N2 et celle de Teotónio.

### 2.3. Conditions de culture

#### 2.3.1. Milieu de vie

Plusieurs milieux de vie peuvent être utilisés afin de réaliser des mesures phénotypiques chez *C. elegans*. Nous aurions pu utiliser une méthode de culture assez courante en écotoxicologie, qui consiste à des tests de toxicité en milieu aqueux, dans des microplaques. Dans ce cas, beaucoup plus d'organismes peuvent être testés pour une plus large gamme de concentrations (Williams & Dusenbery, 1990 ; Dhawan *et al.*, 1999). Néanmoins, certains critères d'effets, tels que le succès reproducteur et certains comportements sont très difficilement observables en milieu liquide. Or il n'est pas recommandé d'introduire un changement de milieu (liquide vers solide) dans des expériences. Cela risque en effet d'apporter un stress supplémentaires pour les individus. Il est aussi possible de travailler avec des échantillons de sol, naturel ou artificiel (Freeman *et al.*, 1999 ; ASTM, 2002). Cela permet de travailler avec un milieu de vie plus proche des conditions naturelles mais les observations sous une loupe binoculaire sont moins

aisées qu'avec un milieu agar (translucide). Nous avons donc choisi d'utiliser un milieu gélosé d'élevage, sur boîte de Petri, le Nematode Growth Medium (NGM ; Brenner, 1974) mais modifié (voir les raisons dans l'article I). L'élevage de *C. elegans* ainsi que les expériences peuvent se faire sur des boîtes de Petri et dans des plaques de culture cellulaire (par exemple plaque 12 puits) contenant le NGM (Figure 9; Stiernagle, 2006). Les valeurs des traits d'histoire de vie sont ainsi aisément observables, ce qui nous importe le plus. Lorsque l'on décide de transférer des individus d'une boîte de Petri à une autre, il suffit d'attraper les individus avec un fil de platine, monté sur une pipette Pasteur, qu'il faut préalablement chauffer pour éviter toute contamination notamment bactérienne (Figure 10).

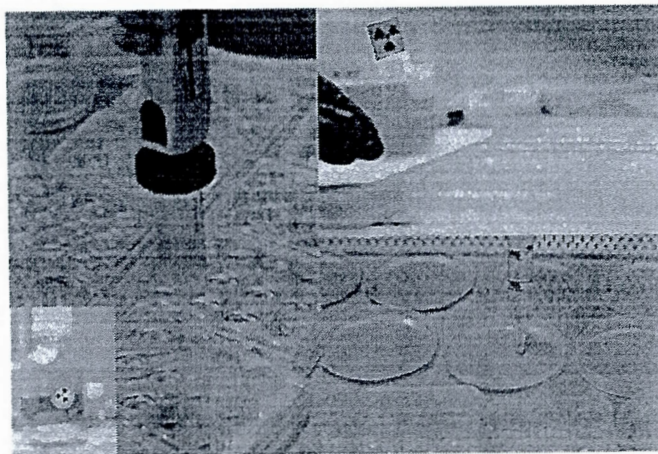


Figure 9. Préparation du milieu de culture (NGM) contaminé avec de l'uranium. Préparation dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre et des plaques 12 puits ; © J-M Bonzom/IRSN.

### 2.3.2. Nourriture

Après le séchage du NGM, les boîtes de Petri ont étéensemencées avec des bactéries *Escherichia coli* Escherich de la variété OP50. Cette souche est auxotrophe à l'uracile ce qui limite sa croissance sur le NGM et donc facilite les observations (Brenner, 1974). La

culture bactérienne est réalisée durant 24h en milieu standard : le bouillon lysogène (= Lysogeny Broth en anglais, LB), dans un incubateur à 37°C et sur une table d'agitation (120 rpm). Ainsi nous pouvons considérer la population à son seuil maximal (Sutphin & Kaeberlein, 2009). Il est cependant possible de re-concentrer les bactéries dans un volume plus faible à travers une étape de centrifugation. L'ensemencement des boîtes de Petri contenant le NGM peut alors être pratiqué. Les bactéries ont été ensuite tuées grâce à l'émission d'UV. Le but était d'éviter au maximum qu'il y ait des différences, en termes de quantité de nourriture, entre les milieux contaminés et les milieux contrôles. En effet, on ne peut pas exclure un effet négatif du polluant sur la croissance bactérienne. De plus, en tuant les bactéries *E. coli*, on évite la mort prématurée des individus âgés (dont la vitesse de digestion est plus lente) à cause de la prolifération de bactéries dans leur tube digestif (Garigan *et al.*, 2002). Il faut aussi noter que le NGM est composé de cholestérol car *C. elegans* ne synthétise pas cette molécule indispensable à son développement. Ce qui signifie que dans la nature, *C. elegans* doit également consommer des eucaryotes ou des moisissures unicellulaires, possédant du cholestérol contrairement aux bactéries (Kessin *et al.*, 1996). Pour plus de détail, le lecteur se référera aux sections « Material and methods » des chapitres suivants (c'est-à-dire les articles).



Figure 10. Transfert d'un individu d'un puits à un autre (plaque 12 puits)  
Transfert réalisé grâce à un fil de platine monté sur une pipette Pasteur et préalablement chauffé ; © J-M Bonzom/IRSN.

## 2.4. Analyses statistiques

Tout d'abord, nous dirons quelques mots sur les modèles linéaires généralisés mixtes (= generalised linear mixed model en anglais, GLMM), puisque nous les avons largement utilisés tout au long de ce travail. Nous avons également choisi d'utiliser ces modèles dans un cadre statistique bayésien et non fréquentiste. Comme l'inférence fréquentiste est plus traditionnellement utilisée en biologie, nous présenterons ci-dessous l'inférence bayésienne et l'intérêt qu'elle avait pour nos études, sans toutefois entrer dans les détails mathématiques.

### 2.4.1. Modèle mixte

Un modèle mixte est avant tout une extension d'un modèle linéaire. Un modèle linéaire est une hypothèse statistique où l'on cherche à exprimer linéairement une ou plusieurs variables réponses (modèles uni- ou multivariés) en fonction d'une ou plusieurs variables explicatives. Un modèle linéaire généralisé permet en plus de créer des modèles pour une variable réponse dont la distribution des erreurs n'est pas gaussienne, mais une distribution de Poisson ou binaire par exemple (Pinheiro & Bates, 2000).

Les modèles mixtes permettent de modéliser la moyenne et la variance d'une variable réponse en fonction d'effets fixes et aléatoires. Souvent, la distinction entre fixe et aléatoire est donnée par des exemples : la population, l'individu, le flacon ou la boîte de Petri sont aléatoires, mais le sexe, le traitement et l'âge sont fixes. Cependant, cela ne confère aucune compréhension de ce que signifie de traiter un effet comme étant fixe ou aléatoire. Lorsque nous traitons un effet fixe, nous considérons que la seule information relative à sa valeur provient des données associées à ce niveau particulier. Les effets fixes

sont donc censés être mesurés sans erreur et leurs valeurs sont les mêmes d'une étude à l'autre. Ce sont les effets étudiés dans les modèles linéaires simples. Si nous traitons un effet aléatoire, nous utilisons également cette information, mais elle est pondérée car d'autres données nous renseignent sur les valeurs probables que les effets pourraient prendre. Ainsi, les valeurs sont considérées comme provenant d'un échantillon aléatoire issu d'une population plus large des valeurs que pourrait avoir cette variable. Ceci permet de généraliser les résultats obtenus à l'ensemble des valeurs possibles de cette variable dans la population (Pinheiro & Bates, 2000).

#### 2.4.2. Inférence bayésienne

L'inférence fréquentiste et bayésienne sont deux méthodes qui donnent des résultats valables et correspondent à de la modélisation stochastique. Leur différence porte essentiellement sur les *a priori* permettant de poser les modèles. L'inférence bayésienne est une méthode utilisant les règles de Bayes pour réviser l'estimation de la probabilité d'une hypothèse lorsque de nouvelles informations sont acquises (Bayes, 1763). L'inférence fréquentiste tire des conclusions à partir d'échantillons statistiques. Depuis le XVIII<sup>ème</sup> siècle, les deux écoles s'affrontent. La vision fréquentiste s'est imposée avec le développement des statistiques, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Toutefois, l'essor de l'informatique a permis un grand développement de l'approche bayésienne.

Lecoutre (2005) explique de manière détaillée la différence entre ces deux approches et notamment, la différence entre un intervalle de confiance et de crédibilité. L'intervalle de confiance obtenu par l'inférence fréquentiste correspond aux bornes pour l'échantillon observé. Les bornes pour un paramètre donné sont donc des grandeurs aléatoires qui varient en fonction de l'échantillon. A l'inverse, dans l'inférence



bayésienne, on cherche explicitement la probabilité des valeurs possibles du paramètre. A partir d'un état de connaissance initial formalisé par une distribution *a priori* et des données, nous obtenons une distribution *a posteriori* qui exprime directement l'incertitude sur le paramètre, en fonction de l'échantillon observé. Ainsi, la distribution *a posteriori* combine l'information initiale et celle des données. On obtient alors un intervalle de crédibilité (nommé ainsi pour le distinguer de l'intervalle de confiance).

Nous avons choisi d'utiliser une méthode bayésienne à partir de l'article II, essentiellement pour deux raisons. Tout d'abord, les estimations des distributions *a posteriori* pour les paramètres (par exemple les variances) nous permettent de faire des calculs d'autres paramètres (par exemple les héritabilités) pour toute la distribution (Figure 11). Ce ne sont donc pas des estimations ponctuelles, comme celles obtenues par l'inférence fréquentiste. Ensuite, dans le cadre de l'utilisation de GLMM par inférence fréquentiste, l'utilisation du maximum de vraisemblance restreint (= restricted maximum likelihood en anglais, REML) est limité avec des modèles utilisant des distributions qui ne sont pas gaussiennes (McCulloch & Searle, 2001). En revanche, les méthodes de Monte Carlo par chaîne de Markov Monte (= Markov chain Monte Carlo en anglais, MCMC) utilisé par les modèles bayésiens sont plus robustes pour les GLMM (Browne & Draper, 2006). Toutefois la méthode MCMC peut être beaucoup plus lente (le temps d'analyse augmente). De plus, les modèles bayésiens sont plus techniques à utiliser, notamment pour la spécification de la distribution *a priori* (= prior), qui n'existe pas pour les méthodes REML. Une attention particulière doit donc être donnée à cette spécification.

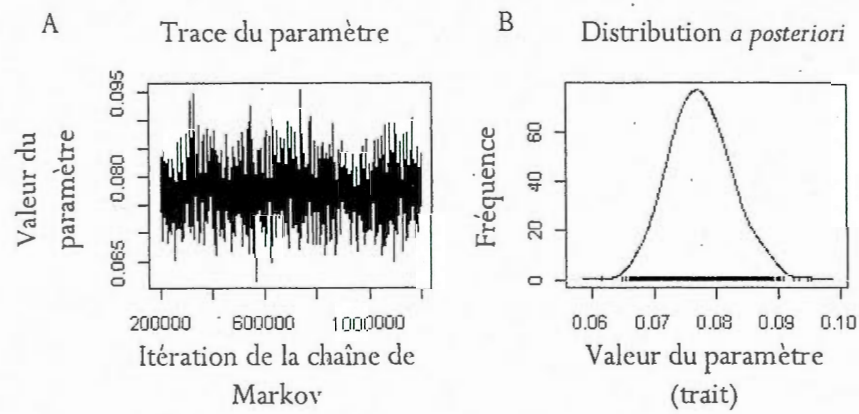


Figure 11. Résultats d'un modèle bayésien.

(A) Tracé de la partie postérieure échantillonnée dans un modèle bayésien, à considérer comme une série chronologique de 1 200 000 itérations pour l'estimation du paramètre. (B) Estimation de la densité *a posteriori* d'un paramètre après 1 200 000 itérations.



---

## OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Dans ce chapitre, sont présentés les quatre objectifs spécifiques de ce travail de doctorat, sous forme de questions. Par ailleurs, pour chacune des questions, les hypothèses sont exposées. À la suite, les résultats et les discussions de nos travaux pour chacun de ces objectifs sont présentés sous forme d'articles scientifiques rédigés en anglais.

### 1. Quels sont les effets à court terme d'une pollution chronique en uranium ?

Avant d'entreprendre toute étude des effets d'un polluant sur l'évolution d'une population (c'est-à-dire étude multigénérationnelle), il est nécessaire de bien connaître à quelles concentrations les effets de ce polluant sont observés sur les traits d'histoires de vie de l'espèce étudiée. Il était en particulier nécessaire de déterminer une gamme de concentrations en uranium allant des concentrations qui ne perturbent pas la reproduction des individus aux concentrations entraînant la mort de 100 % des individus au sein de la population. De plus, à travers cette première expérience, nous voulions mesurer les effets de l'uranium sur les trois premières générations d'exposition pour commencer à appréhender la direction de la réponse évolutive pour chacun des traits étudiés. Nous souhaitions également mesurer la capacité d'acclimatation de la population dans un milieu contaminé à l'uranium. A notre connaissance, il existe extrêmement peu de données concernant les effets de l'uranium sur *C. elegans* (et sur les Métazoaires terrestres plus généralement), et aucunes sur la reproduction ou la croissance (Jiang *et al.*, 2007 ; Jiang *et al.*, 2009).

#### Hypothèses :

- 1- L'augmentation de la concentration en uranium dans le milieu affecte les traits d'histoire de vie de *C. elegans* selon une relation dose-réponse.
- 2- Par rapport aux effets à la 1<sup>ère</sup> génération, les effets de l'uranium s'amplifient durant les générations suivantes.

NB : Nous avons également mesuré, sur une seule génération, les effets du sel à différentes concentrations sur *C. elegans* (annexe B).

2. Quels sont les effets à court terme de l'uranium et du sel sur l'expression de la structure génétique des différents traits d'histoire de vie ?

La deuxième étape de ce projet était d'estimer la structure génétique des traits analysés et pour les concentrations en polluants retenues (voir article I et annexe B), car la variabilité génétique est un facteur essentiel à l'évolution d'une population. Les traits que nous avons choisis sont quantitatifs. Cette variation quantitative est supposée être influencée par un grand nombre de gènes aux effets individuels minimes (information génétique transmise dans les œufs pondus) et par l'environnement (milieu de développement). La distribution de ces traits est supposée suivre souvent une distribution normale même si d'autres distributions existent (Falconer & Mackay, 1996).

Afin de faire face à la pollution par la sélection naturelle, la population de *C. elegans* étudiée doit disposer de mécanismes de résistance permettant une résistance, *a minima* chez certains génotypes. Le potentiel évolutif des individus à vivre dans un environnement très stressant dépendra de l'intensité des pressions de sélection, mais aussi de la structure génétique des traits d'histoire de vie. Si l'expression de cette structure peut changer dans un environnement stressant, il est nécessaire de quantifier ces changements afin d'estimer le potentiel évolutif de la population dans ce nouvel environnement. Nous avons donc étudié l'expression de la structure génétique des traits dans trois environnements (contrôle, uranium, sel) chez des lignées isogéniques.

#### Hypothèses de travail :

- 1- Il existe une structure génétique des traits d'histoire de vie.
- 2- La structure génétique est stable malgré les changements d'environnement.

3. Quelle est la vitesse de réponse microévolutive des traits d'une population exposée à une pollution pendant plusieurs générations ?

L'objectif principal de cette partie était de mettre en évidence les modifications des valeurs de traits au travers des générations et de tester si ces modifications étaient associées à des changements génétiques intergénérationnels. En effet, l'habilité d'une population à s'adapter à des stress environnementaux dépend de sa variation génétique pour certains traits d'histoire de vie écologiquement essentiels. Pour ces traits polygéniques, les fréquences des allèles sur de nombreux loci peuvent changer en réponse à la sélection (Falconer & Mackay, 1996). Nous nous sommes intéressés également à la structure phénotypique entre les traits d'histoire de vie pour mettre en évidence tout changement de la structure génétique au cours du temps.

Il est également supposé qu'un environnement fluctuant pourrait exercer des pressions de sélection variables sur une population, ce qui maintiendrait une certaine variance génétique des traits, contrairement à un environnement constant (par exemple Reed *et al.*, 2003). Ainsi, les populations vivant dans un environnement variable devraient révéler une réponse évolutive plus faible. Dans cette expérience, nous avons quantifié les modifications phénotypiques d'une population de *C. elegans* exposée, pendant plusieurs générations, à différentes pollutions de son milieu de vie.

Hypothèses de travail :

- 1- Les traits répondent à la sélection en quelques générations (microévolution).
- 2- La vitesse de réponse évolutive dépend du polluant (pressions de sélection différentes).
- 3- La vitesse de réponse évolutive dépend du type de pollution (constante ou fluctuante).
- 4- La réponse évolutive est dépendante de l'architecture génétique.

#### 4. La sélection entraîne-t-elle des coûts adaptatifs ?

Localement, la diversité génétique des populations naturelles de *C. elegans* augmente fortement par rapport à leur diversité mondiale (Barrière & Félix, 2005a). Or dans le cas où une population s'adapte à certaines concentrations sublétales d'un polluant (voir article III), la force de la sélection peut induire une hyperspécialisation et des coûts sont alors associés à cette adaptation. Toutefois cette population peut être capable de faire plus facilement face à une autre pollution plus sévère, grâce à la sélection de certains individus : les plus résistants ou ceux s'acclimatant le plus vite et le mieux. C'est une sélection de la résistance (par exemple Ward & Robinson, 2005 ; Jansen *et al.*, 2011b). Ainsi, selon le nouveau milieu dans lequel les populations sont placées après une évolution dans un milieu pollué, les répercussions sur les traits d'histoire de vie peuvent être positives ou négatives. Ces risques doivent être identifiés et pris en compte dans l'évaluation des risques écologiques associés à la pollution pour améliorer sa pertinence. Nous avons donc réalisés des expériences en jardins communs et de transplantations réciproques dans différents environnements pour évaluer les coûts adaptatifs aux pollutions précédemment étudiées (voir question précédente).

#### Hypothèses de travail :

- 1- Une part des modifications phénotypiques est due aux adaptations de la population aux pollutions (différentiation génétique).
- 2- La valeur sélective des populations adaptées à une pollution est plus faible, dans un environnement sans contamination ou un nouvel environnement stressant, que celle des populations originelles.
- 3- Les coûts adaptatifs se mettent en place progressivement, en fonction de la réponse évolutive.
- 4- Les coûts adaptatifs sont plus faibles pour des populations adaptées à une alternance de deux polluants qu'à une pollution constante.





## ARTICLE I

### RAPID PHENOTYPIC CHANGES IN *CAENORHABDITIS ELEGANS* UNDER URANIUM EXPOSURE

Morgan Dutilleul, Laurie Lemaire, Denis Réale, Catherine Lecomte, Simon Galas, Jean-Marc Bonzom. Submitted to *Ecotoxicology*

#### Abstract

When exposed to a pollutant affecting fitness, populations can be affected by novel selection pressures related to the exposition, and that depend on the concentration of the pollutant. The main ways to respond to the stress are acclimation (i.e. plastic changes) and adaptation (i.e. genetic changes). Acclimation provides a quick and short response to environmental changes and adaptation can have longer-term implications on the future of the population. One way of studying these responses is to conduct studies on the phenotypic changes occurring across generations in populations experimentally subjected to a selective factor (i.e. multigenerational test). Such never been performed with uranium (U). Here, we explore the phenotypic changes across three generations in experimental *Caenorhabditis elegans* populations exposed to different U concentrations. In the first generation we detected significant negative effects of U on survival, generation time, brood size, body length and body bend. These effects increased with increasing U-concentration. Besides, the strength of selection pressures induced by different U-concentrations changed the direction of the phenotypic response across generations: negative effects were reduced for lower U-concentrations indicating a potential improvement by acclimation, and were amplified for high U-concentrations. Consequently, under high U-concentrations acclimation may not permit the population to avoid extinction and the only way to face pollution seemed to be adaptation to uranium in the subsequent generations. Our results highlight the need to consider changes across generations to enhance environmental risk assessment related to U-pollution.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*, chronic exposure, experimental-evolution, phenotypic changes, uranium



## 1. Introduction

The demographical consequences of pollutants on populations have largely been studied in ecotoxicology. However, most of these studies have focused their attention on within-generation effects, whereas it is well known that pollutants acting on both survival and reproduction could also lead to evolutionary changes occurring across several generations (reviewed by Coutellec & Barata, 2011). Such evolutionary changes can modulate the demographic responses of the population to the pollutant over time (e.g. evolutionary rescue: Bell & Collins, 2008). Therefore, it is important to examine how populations are affected by the pollutant by studying more than one generation.

Populations can show three different types of response to a change in the environment: (i) within-individual phenotypic plasticity (Scheiner, 1993); (ii) cross-generation phenotypic plasticity (i.e. maternal effects; Räsänen & Kruuk, 2007); and (iii) rapid genetic changes through selection of different genotypes (i.e. local adaptation; Hedrick, 2006 ; Hendry & Gonzalez, 2008). The first two types of response can be detected as soon as the first and the second generations that experience the change in environmental conditions, and are generally called acclimation. For example, in the case of pollution, individuals can suffer negative effects on several life history traits during the first generation and its effects can be amplified or attenuated in the next generation (Wang & Wang, 2008a ; Massarin *et al.*, 2010 ; Coutellec *et al.*, 2011). In contrast, selection acts across generation through differential reduction of individuals' fitness depending on their sensitivity to the new environmental conditions or even elimination of the most sensitive individuals (Ward & Robinson, 2005 ; Medina *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007). When selection pressures are too strong, acclimation may not be sufficient for the population to withstand the stress induced by the new environmental conditions (Morgan *et al.*,

2007). It leads evolutionary response to selection to be the only effect responsible for most of the phenotypic changes observed between generations.

The power of detection of the evolutionary response depends on both the strength of selection pressures and on the heritability of the resistance trait, and increases with the number of generations (Hoffmann & Merilä, 1999). Long-term exposure to a pollutant is assumed to have led to local adaptation and improved resistance in populations exposed to heavy metal pollution (Shirley & Sibly, 1999 ; Reed *et al.*, 2003 ; Hendry *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007 ; Hendrickx *et al.*, 2008). Therefore, it is essential to consider multigenerational responses to highlight the evolutionary dynamics of a population to pollution.

In this study, we examined the phenotypic responses of *Caenorhabditis elegans* populations to contamination by different uranium (U) concentrations across three generations. Although the evolutionary changes increase with the number of generations (Lynch & Walsh, 1998), only three generations are necessary to know the direction of that response of the trait to selection. Three generations is the minimum number to be able to evaluate the impact of the three different evolutionary processes that allow a population to respond to changes in their environment. Phenotypic plasticity and selection are combined to modify the affected traits within the first generation subject to the change in the environment (e.g. a novel pollutant). Inter-generational plasticity and selection both can explain the changes in the trait from generation one to generation two. From generation two to generation three, plastic effects are assumed to have the same effect at all the generations and are not responsible for any more changes between generations. So, only selection pressures can explain a further change in the trait (Scheiner, 1993 ; Mousseau & Fox, 1998 ; Gagliano & McCormick, 2007 ; Räsänen & Kruuk, 2007). Information

provided by a three-generation experiment can thus improve our knowledge of the risks associated with a range of concentrations of a pollutant, while keeping experiments as short as possible.

The concentration of U, a natural radioactive heavy metal, in sediments or surface soils has increased recently as a result of human activities (e.g. mining, scientific research, military use of depleted uranium). On average, the concentration of natural U is 2 mg U kg<sup>-1</sup> in soil (~0.008 mM U). However, concentrations in contaminated sites can reach up to 50 to 1000 mg U kg<sup>-1</sup> (~0.2 to 4.2 mM U; UNSCEAR, 2000). For example, maximum concentrations of 110 mg U kg<sup>-1</sup> dry wt (~0.5 mM U) have been detected in soils near mining sites in Australia (Lottermoser *et al.*, 2005). Consequently, the organisms in these environments have been found to suffer high U-toxic effects (e.g. terrestrial invertebrates, zooplanktonic invertebrates, epibenthic macro-invertebrates and fish; Sheppard *et al.*, 2005 and references therein). Exposure to natural U, whose main isotope is <sup>238</sup>U (99.3%), may induce both chemical and radiological (alpha particle emission) effects. Because of its low specific activity (2.53 × 10<sup>4</sup> Bq.g<sup>-1</sup> U), U is assumed to have higher chemotoxic than radiotoxic effects (Kuhne *et al.*, 2002). Nonetheless, its radiotoxicity cannot be neglected (Thomas & Liber, 2001).

Free-living forms of the nematode *C. elegans* have been used as a model to assess both (i) the toxicity of heavy metals and other pollutants (Swain *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2009; Tominaga *et al.*, 2003 ; Harada *et al.*, 2007 ; Sochová *et al.*, 2007), and (ii) the evolutionary responses to several selective agents (e.g. pesticides: Lopes *et al.*, 2008; starvation: Morran *et al.*, 2009; parasites: Schulte *et al.*, 2010). *C. elegans* is a ubiquitous species, and some populations probably experienced U-contaminated soil. Furthermore, *C. elegans* represents a powerful model to conduct experiments in evolutionary

ecotoxicology because of its life cycle, small size and ease of handling and cultivation in various devices (Brenner, 1974). Most of the studies mentioned above have limited their assessment of the selective effects of the pollutant to the first generation, and only a few have reported how exposure to a heavy metal at the first generation affected the population at the second (Wang & Yang, 2007 ; Wang & Wang, 2008a) or the third generation (Wang *et al.*, 2007). Although the observed effects at the first generation are potentially transferable to subsequent generations, their extrapolation is difficult because of the impossibility of disentangling the effects of phenotypic plasticity, parental responses, and of selection occurring during the first two generations. Finally, previous reports have focused on the U concentration-mortality relationship (Jiang *et al.*, 2009) and have neglected potential effects on other life-history characteristics.

In order to understand how U-pollution can act on the evolutionary dynamics of *C. elegans* populations, we monitored the effects of U on changes in life history, morphologic and behaviour traits over three generations in a laboratory population. Studied traits (i.e. survival, generation time, brood size, locomotion and body length) were related to fitness at different degrees and to population dynamics (Mousseau & Roff, 1987 ; Roff, 2002b). We examined if phenotypic responses were affected differently by different U-concentrations (ranging from 0.16 to 2.53 mM) and if the stress-induced evolutionary mechanisms can be highlighted after three generations.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Strain preparation and metal exposure

We used the wild-type N2 nematode population provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resources). Populations were

maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* strain OP50, at 20°C (Brenner, 1974 ; Stiernagle, 2006). For the particular needs of our experiments we replaced 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) in the NGM with 25 mM HEPES buffer (pH 5.5; Sigma-Aldrich, France) which did not caused any effect on survival, growth, reproduction and locomotion behaviour of worms (Dutilleul, unpublished results). Inorganic phosphate binds with U which can lead to uranyl phosphate formation. This complex formation may decrease the bioavailability and toxicity of U on aquatic plants (e.g. Mkandawire *et al.*, 2007) or *C. elegans* (Dutilleul, unpublished results). U was added to the liquid NGM just before pouring the medium into the plates. For each desired concentration we added 6 ml of a diluted solution of uranyl nitrate ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich, France) in 200 ml of NGM. For the purpose of this study we used 10 nominal U-concentrations: 0 (control), 0.1, 0.5, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.5 mM U. NGM was left overnight to solidify. We then collected agar samples (100  $\mu\text{l}$ ) from each medium and stored them at 4°C prior to the measurement of U-concentrations. Samples were digested using a combination of 1 ml  $\text{HNO}_3$  (65%) and 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 90°C, and measurements were obtained using the ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA; detection limit 0.04  $\mu\text{M}$ ).

We grew *E. coli* OP50 cultures in L Broth rich medium at 37°C overnight. Then 250  $\mu\text{l}$  of saturated culture was seeded on the plates and left overnight to allow the bacterial culture to dry. Plates were then top-exposed to UV doses for 90 sec to kill the bacteria (Bio-Link Crosslinker;  $\lambda=254\text{ nm}$ ; intensity = 200  $\mu\text{watt.cm}^{-2}$ ). The main aim of this treatment was to avoid different bacterial growth in control and U-contaminated plates.



## 2.2. Experimental design

Gravid worms were selected from the stock population and placed on a Petri dish at  $t = 0$  h. After 2 h, released fertilized embryos were considered to be age-synchronized. Fifty embryos were placed on U-contaminated plates (4 replicates for each U-concentration). These embryos represented the first generation in our experiment (P0). At  $t = 96$  h, adult worms from P0 were transferred onto new plates with the same U-concentration as in P0, and left for 2 h for embryo collection and preparation of the next generation (F1). The same protocol was repeated to create the third generation (F2). Worms were cultured for these 3 generations at 20°C and 80% relative humidity.

## 2.3. Life history and behaviour measurements

From  $t = 48$  h, we studied 5 endpoints: (i) survival, (ii) generation time, (iii) brood size, (iv) body length, and (v) body bend frequency. To measure survival we stimulated each worm with a platinum transfer pick. Worms that did not move their body or their head in response to three repeated stimulations were scored as dead (Sutphin & Kaeberlein, 2009).

To assay generation time and brood size we transferred worms into individual wells (12 worms / treatment, 3 / replicate) containing U-contaminated NGM. Each well was visually inspected every 2 h until  $t = 65$  h. Generation time was calculated as the time between the embryo transfer into the well and its first released embryo. Adults were then transferred twice into a new well every 36 h. Hatched progeny were counted the day after each transfer (Swain *et al.*, 2004). Using this method allowed us to fully count brood size.

Body length was measured at  $t = 72$  h. Twenty worms per treatment (including the 12 individuals used to measure generation time and brood size) were photographed using a stereomicroscope with a computer-connected camera (LAS<sup>®</sup> Leica imaging software). We measured body bend frequency at  $t = 72$  h by picking up worms and placing them onto a new plate without bacteria. We counted the number of body bends over 20 s. One body bend equals a change in the direction of the anterior part of the worm (including the posterior bulb of the pharynx) along the Y axis using the body of the worm as the X axis (Tsalik & Hobert, 2003).

#### 2.4. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with the statistical computing software R (R Development Core Team, 2012). We fitted concentration-survival regression for estimation of the  $LC_{50}$ . The assumption of normality of the errors was tested with the Shapiro-Wilk test. When this assumption was not satisfied, data were square-root or Box-Cox transformed. Survival at  $t = 48$  h was analysed by ANOVA using Dunnett's comparison with a control test. The other endpoints were tested by linear mixed models, where treatment, generation and treatment \* generation were included as fixed effects and replicate was included as a random effect. When the interaction was significant, we ran separate mixed models for each generation and for each treatment, using replicate as a random effect. These analyses were followed by Tukey's all-pair comparison tests (or t-test when only two groups were compared) on treatments in models for each generation and on generations in models for each treatment (Bretz *et al.*, 2010). Differences in brood size among the different U-concentrations were also tested at each generation using ANCOVA with body length as a covariable.



### 3. Results

#### 3.1. Contamination of NGM

Initial U-concentrations in the NGM obtained by ICP-AES were 0, 0.16, 0.48, 0.88, 1.14, 1.34, 1.57, 1.75, 1.97 and 2.53 mM, respective to the nominal concentrations (see section 2.1). These concentrations deviated from the nominal concentrations by 0%, 60%, -4%, -12%, -5%, -4%, -2%, -3%, -2% and 1%, respectively. Actual initial concentrations are used throughout the text and in the figures.

#### 3.2. Trait measurements

After 2 days of exposure, the mean survival at P0 decreased significantly with U-concentration (Figure 12,  $F_{9,30} = 51.01$ ,  $P < 0.001$ ). Mean survival in the control at P0 was  $95.5 \pm 5.2\%$ . Mean survival varied from  $63.3 \pm 7.9\%$  at 1.34 mM U to 0% at 2.53 mM U (Dunnett,  $P < 0.001$  from 1.34 mM U). The lethal concentration for 50.0% of individuals ( $LC_{50}$ ) at 48 h was 1.71 mM (95% CI = 1.62-1.80).

For U-concentrations equal to or higher than 1.57 mM, no worms survived after 96 h of exposure. At 1.34 mM U, worms did not release any embryo at all (Figure 13B). As a result, there was no data available after 1.34 mM U for generation time, brood size, body length and body bend frequency. Thus, we could only analyse the effects of treatment for U-concentrations up to 1.34 mM. Moreover, at F1 and F2 survival in the different treatments was not significantly different from the control (Dunnett,  $P > 0.05$ ), except for the higher measurable concentration at F1, 1.14 mM (Dunnett,  $P = 0.031$ ). There was a significant interaction between treatment and generation on the different traits

measured (generation time:  $F_{7,147} = 37.72$ ,  $P < 0.001$ ; brood size:  $F_{8,140} = 31.52$ ,  $P < 0.001$ ; body length:  $F_{8,296} = 27.27$ ,  $P < 0.001$ ; body bend:  $F_{8,301} = 5.00$ ,  $P < 0.001$ ).

When analysed separately from treatment, generation time increased significantly with U-concentration at each generation (P0:  $F_{4,47} = 85.07$ ,  $P < 0.001$ ; F1:  $F_{4,53} = 187.19$ ,  $P < 0.001$ ; F2:  $F_{3,44} = 15.37$ ,  $P < 0.001$ ). The delay in generation time in the U-contaminated media relative to the control started to be significant at 0.48 mM U at both P0 and F1 (Tukey test,  $P < 0.001$  in both generations), and at 0.16 mM U at F2 (Tukey test,  $P < 0.001$ ; Figure 13A). The longest delay was observed at 1.14 mM U for F1 (Tukey test,  $P < 0.001$ ). We could not measure generation time for U concentrations higher than 1.14 mM at F2 because of the high variability in the generation time in F1 and F2, embryos hatched inside the adult. A significant delay in generation time was found for F2 worms at 0.88 mM U ( $F_{2,28} = 5.33$ ,  $P = 0.01$ ) and for F1 worms at 1.14 mM U ( $t_{21} = 10.05$ ,  $P < 0.001$ ).

There was an overall significant decrease in brood size with U-concentration at each generation (P0:  $F_{4,50} = 27.72$ ,  $P < 0.001$ ; F1:  $F_{4,44} = 117.60$ ,  $P < 0.001$ ; F2:  $F_{4,46} = 238.71$ ,  $P < 0.001$ ). For example at generation P0, mean brood size in the control was 248 larvae and 145 larvae at 1.14 mM U (Figure 13B; Tukey test,  $P < 0.001$ ). Brood size increased significantly from P0 to F1, at 0.16 and 0.48 mM U ( $F_{2,29} = 7.80$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{2,25} = 4.75$ ,  $P = 0.02$ ), and from P0 to F2 at 0.88 and 1.14 mM U ( $F_{2,24} = 7.90$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{2,31} = 404.69$ ,  $P < 0.001$ ). At 1.14 mM U, brood size decreased significantly between P0 and F1 (i.e. 48 larvae; Tukey test,  $P < 0.001$ ), and between P0 and F2 (i.e. 5 larvae; Tukey test,  $P < 0.001$ ). The decrease in brood size was not associated with an increase in the number of dead embryos: we observed 98 to 100% of hatchings in all treatments and at all the generations (Dutilleul, unpublished results).

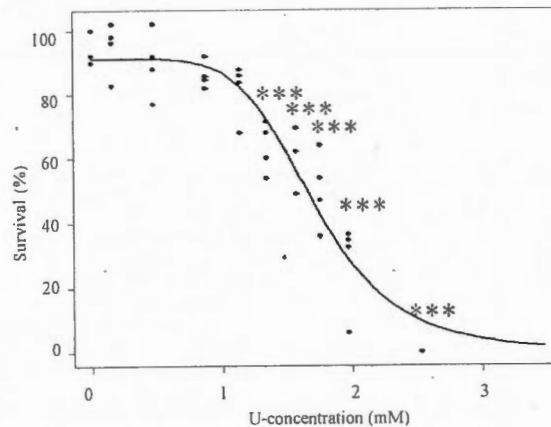


Figure 12. Percentage of *C. elegans* surviving at generation P0 after 48 h of exposure to different U-concentrations.

Each concentration was represented by 4 replicates (50 individuals in each replicate). Asterisks indicate significant differences between each U-concentration and the control (\*\*\*:  $P < 0.001$ ). The continuous line is the curve concentration-survival: LC50 at 48 h was  $1.71 \pm 0.09$  mM.

Mean body length was 1.02 mm at 72 h in the control at generation P0 (Figure 13C). It decreased significantly with U-concentration at each generation (P0,  $F_{3,95} = 156.41$ ,  $P < 0.001$ ; F1:  $F_{4,91} = 78.68$ ,  $P < 0.001$ ; F2:  $F_{4,104} = 244.6$ ,  $P < 0.001$ ). From 0.16 to 1.14 mM U, the body length improved at F2, compared to F1, even if the values were below the control and sometimes below P0. For example at 1.14 mM U, mean body length at each generation was 0.85, 0.47 and 0.64 mm, respectively ( $F_{2,52} = 122.93$ ,  $P < 0.001$ ). At P0 generation, mean body length at 1.34 mM U was extremely small: 0.31 mm. However, the worms were not adult and they never reached this stage before dying (data not shown).

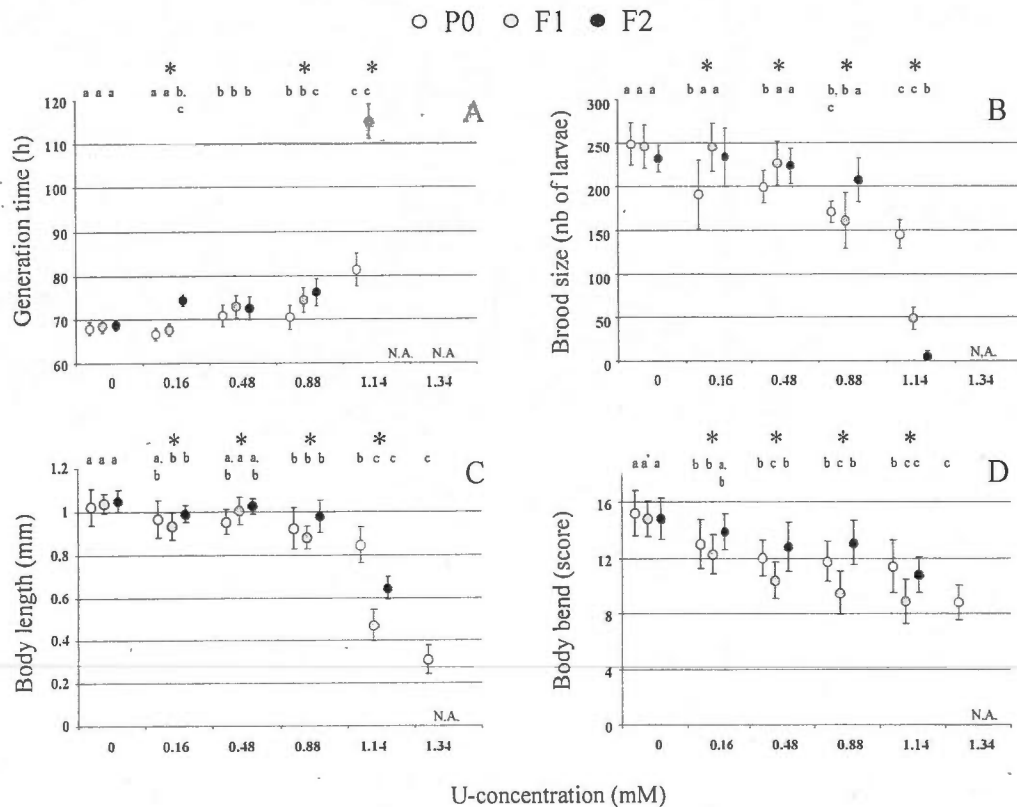


Figure 13. Changes in phenotypic traits (mean  $\pm$  SD) of *C. elegans* exposed to different U-concentrations and across three generations P0 (black circle), F1 (grey circle) and F2 (white circle). (A) Generation time; (B) Brood size; (C) Body length; (D) Body bend. Different small capitals and asterisks on top of the histograms indicated significant differences ( $P < 0.05$ ) between two treatments and between generations for the treatment below, respectively. N.A. = non-available data, caused by bagging (eggs hatch inside the adult) or 100% mortality or infertility after a certain U-concentration.

Mean body bend frequency over 20 s in the control at generation P0 was 15.2 (Figure 13D). Body bends decreased with U-concentration at each generation (P0:  $F_{5,111} = 37.04$ ,  $P < 0.001$ ; F1:  $F_{4,95} = 51.14$ ,  $P < 0.001$ ; F2:  $F_{4,91} = 24.23$ ,  $P < 0.001$ ). Body bends decreased significantly between 0.48 and 1.14 mM U, respectively, for F1 and F2 (Tukey test,  $P < 0.001$ ). Moreover, from 0.48 to 1.14 mM U, body bends decreased for F1 but increased again for F2. The values at F2 were at least non-significantly different from the

values at P0, or even significantly higher. For example, at 0.88 mM U, mean body bend values at P0 and F2 were 11.8 and 13.1, respectively (Tukey test,  $P = 0.02$ ).

### 3.3. Growth-reproduction correlation

We further compared the relationship between brood size and body length at each generation to determine whether reproductive strategy remained the same across the generations. Brood size increased with adult body length for the 3 generations (Figure 14; slopes:  $t_{135} = 4.26$ ,  $P < 0.001$ ). The slopes were not significantly nonparallel between P0 and F1 (slopes:  $t_{135} = 1.51$ ,  $P = 0.13$ ), therefore, the relationship seemed to be similar. However, the relationship was significantly different between P0 and F2 (slopes:  $t_{135} = 4.63$ ,  $P < 0.001$ ). This significance existed due to the highest U concentration. Indeed, if we omit 1.14 mM at F2 generation, the relationship is not significantly different to P0 (slopes:  $t_{124} = -1.31$ ,  $P = 0.20$ ).

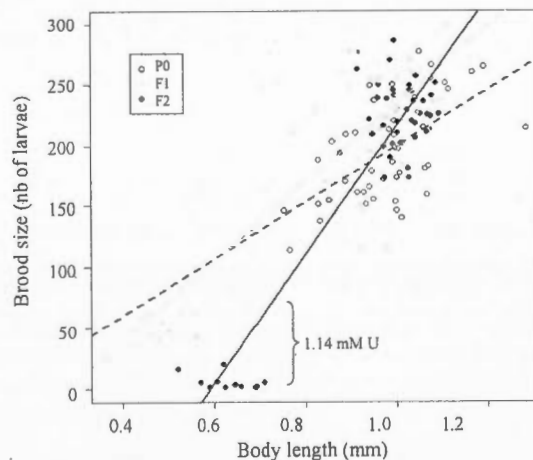


Figure 14. Brood size as a function of adult body length after 72 h of exposure to U-concentrations. Open circles: generation P0, grey cross: F1, filled circles: F2. Regression lines associated with each generation; dashed line: P0, grey line: F1, black line: F2.



#### 4. Discussion

In this study, we observed different effects of U on several life history traits in *C. elegans*, in only three generations. The effects of U on these traits increased with increasing concentration in the medium. We will first discuss the effects of U on survival and other traits in the first generation. We will then explain how some evolutionary mechanisms can act to produce rapid phenotypic changes in only three generations and their potential consequences on population dynamics.

##### 4.1. Acute toxicity on survival

The range of U-concentrations affecting the survival of the *C. elegans* N2 strain (from 1.34 mM U) differed from other invertebrate models. This range is 10 times higher than for *Chironomus riparius* (Dias , 2008), 1000 times higher than for *Daphnia magna* (Zeman , 2008), but 10 times lower than for *Tubifex tubifex* (Lagauzère *et al.*, 2009). However, time and conditions of exposure differed between each of these experiments, and a comparison of the effect of U on different organisms should be made with caution. To our knowledge, only one study has assessed the effects of U on the survival of *C. elegans* (also strain N2: Jiang *et al.*, 2009). In that study, L1 worms were exposed to U in water medium for 30 min. Survival was assessed 24 h later on NGM plates and the  $LC_{50}$  was found to be  $66.9 \mu\text{M} \pm 30.9$ , at a concentration 25 times lower than in our bioassay. The differences between the study by Jiang *et al.* and the present study can be attributed to different environmental conditions. Jiang *et al.* exposed the nematodes to U in water, whereas in our study the nematodes were exposed to U in agar where the effects of U could be reduced, especially because individuals did not develop in a contaminated water column but on a contaminated agar surface. Differences in the mode of exposure can have strong consequences on U bioavailability, which depends on its concentration and also its

chemical form according to the conditions of exposure (Zeman *et al.*, 2008 ; Misson *et al.*, 2009).

When compared to the LC<sub>50</sub> of ten other heavy metals on the same N2 strain (Wah Chu & Chow, 2002), U seems to be one of the heavy metal with the lowest effect on *C. elegans* survival. However, in the study by Wah Chu & Chow(2002), survival was measured in liquid medium over 4 days instead of 48 h in agar medium as in our study. Our results confirm the U-sensitivity of *C. elegans* within the range observed for other heavy metals.

#### 4.2. Chronic toxicity on biological measurements in the P0 generation

*C. elegans* exposed to U showed a decrease in mean brood size and an increase in generation time. The same trends were found when N2 strain was exposed to nickel or cobalt (Wang *et al.*, 2007 ; Wang & Wang, 2008a). Our results also show an amplification of these two reproductive traits according to increased U concentration, a longer generation time and a smaller brood size. Forbes & Calow(2002) demonstrated that any negative effects on larval production will lead to even more adverse consequences at the population level. Indeed, the progeny production directly affects the population growth rate, an extremely robust endpoint in ecological risk assessment (Forbes & Calow, 1999 ; Billoir *et al.*, 2007).

Growth was negatively affected by exposure to U. At 1.34 mM U, worms had still not reached their adult stage at 3 days and were more than 3 times smaller than control worms. Heavy metals such as cobalt or lead have been shown to cause the same effects on growth (Wang & Yang, 2007 ; Wang *et al.*, 2007). The toxic effects of U on growth



have also been found in other invertebrates such as *C. riparius* and *D. magna* (Dias *et al.*, 2008 ; Massarin *et al.*, 2010). The reduction in body size could be explained by the negative effect of U on food assimilation. In *D. magna* and the earthworm *Eisenia fetida*, U severely affected the intestinal epithelium suggesting that this might result in dysfunctions in food assimilation (Giovanetti *et al.*, 2010 ; Massarin *et al.*, 2010).

The lowest concentration of U affected locomotion behaviour and the frequency of body bends decreased with U. It was reported that U produces a central sensorimotor deficit in laboratory rats (Abou-Donia *et al.*, 2002). This could be related to oxidative stress which plays a key role in the mechanism of U neurotoxicity (Lestaevel *et al.*, 2009). In addition, heavy metals commonly decrease the frequency of body bends in the N2 strain (Wang & Xing, 2008).

#### 4.3. Changes after three generations of exposure

After a rapid decline at the first generation, brood size, body length and body bend were enhanced after 3 generations of exposure from 0.16 to 0.88 mM U despite stable environmental conditions during the experiment and for each treatment. These traits are directly or indirectly related to the fitness of individuals, and thus an increase in their values should have positive consequences on the dynamics of the population (Forbes & Calow, 2002). An increase in generation time after 3 generations could also participate in this demographic improvement. Indeed, an increase in generation time may help reduce the negative impact of a pollutant on fitness as the progeny will be in contact with the pollutant as late as possible (e.g. bagging, see below). However, effects on the progeny through the parents should not be ignored and longer generation time directly affects population growth rate (Forbes and Calow, 2002).

There was a general tendency for traits (except generation time) to decrease at F1. As at P0, individual phenotypic values illustrate the direct effect of U on the plasticity of their development, combined with the potential differential survival associated with phenotypic differences (i.e. direct effect of selection within a generation) (Hoffmann & Merilä, 1999). Phenotypic values measured in F1 individuals are subject to both developmental plasticity and direct selection. Heritable traits have been affected by the effect of natural selection occurring in the previous generation (Roff, 1997). In addition, traits can be affected by intergenerational plasticity through the effect of U at P0 on their parents reproductive performance (Gagliano & McCormick, 2007). This hypothesis is supported by results from other studies. For example, similar negative effects on the progeny were observed in *C. elegans* exposed to cobalt, lead and nickel (Wang & Yang, 2007 ; Wang *et al.*, 2007 ; Wang & Wang, 2008a) and on *D. magna* exposed to U (Massarin *et al.*, 2010). Thus, biological defects can be transferred to the progeny even if it does not live in a polluted medium. Phenotypic measures of F2 individuals are still subject to similar developmental plasticity, direct selection, and maternal effects since their parents also lived in a U-polluted medium. Furthermore, their traits will be affected by the evolutionary response to selection between F1 and F2. Consequently, the improvement in traits (except generation time) at F2, could be due to rapid evolutionary response to U-exposure (Medina *et al.*, 2007). Adaptive processes can occur quickly and for a harsher level of pollution or constraints (Roff, 2002b).

The effect of U on brood size across generations is particularly interesting. At lower U-concentrations, brood size increased significantly between P0 and F1, but only started to increase between F1 and F2 at 0.88 mM. Thus, the possibility for this phenotypic trait to improve is slower for a higher strength of selection pressures. At the highest concentration where it could be measured (i.e. 1.14 mM), brood size showed a decline

of 66% between P0 and F1 and of 96% between P0 and F2. When selection pressures of U-exposure were lower, most individuals could probably cope with stress due to acclimation (phenotypic plasticity). For example, individuals could produce enough metallothioneins to protect themselves against U-exposure (Jiang *et al.*, 2009). Under harsher environmental conditions (such as 1.14 mM U), the effects of selection pressures were too strong to overcome it by developmental plasticity or maternal effects, and thus in the generations after F2, the only way to improve fitness will be by evolutionary response. Besides, the strong mortality in a harsh environment reduces both population size and the genetic variance of the traits under selection, which affect the evolutionary potential of those traits (Hoffmann & Merilä, 1999 ; Wilson *et al.*, 2006 ; Bell & Collins, 2008). Under the harshest environmental conditions (i.e. 1.34 mM U), infertility and mortality increased to 100% and annihilated any potential for evolutionary response. It should be noted that we used 50 individuals per replicate in that experiment. Using larger population sizes may have moved the threshold of population extinction to a higher concentration as a few individuals may have had the chance to survive and reproduce. The chance of evolutionary rescue in a population increases with its size (Holt & Gomulkiewicz, 1997 ; Bell & Collins, 2008 ; Willi & Hoffmann, 2009).

The increase in toxic effects on reproduction under high U concentrations is consistent with the toxic effects of U on *D. magna* (Massarin *et al.*, 2010). The delay of first brood for *D. magna* increased and the fecundity at 21 days reduced more and more at the F1 and F2 generation. Tominaga *et al.* (2003) showed more severe effects of phenols on *C. elegans* fecundity at the fourth generation than the first generation. The results of these studies did not show increasing resistance to the pollutant in the first few generations. This does not mean that adaptation is not possible or more visible a few generations later or with a larger number of individuals. Individuals in populations of *D. magna* and *C. elegans* have

the ability to adapt to pollutants (Ward & Robinson, 2005 ; Lopes *et al.*, 2008). Rapid evolutionary changes have been shown to improve the ability of populations to reduce the probability of extinction (Bell & Gonzalez, 2009 ; Willi & Hoffmann, 2009).

At 1.14 mM U, the few L1 individuals that were produced at F2 hatched inside their parents. This explained the different relationship between brood size and adult body length observed between F2 and the first two generations (Figure 14). The phenomenon called bagging (or matricidal hatching) is assumed to represent an example of phenotypic plasticity in *C. elegans* to extreme conditions such as starvation or high salt concentration (Chen & Caswell-Chen, 2003, 2004). In these studies, bagging favoured dauer formation, a dormancy stage that allows the species to survive in stressful conditions (Golden & Riddle, 1984). Studies on heavy metals have never shown the induction of dauer formation. This may be explained by the fact that the dauer cuticle does not confer any resistance to heavy metals (Barsyte *et al.*, 2001 ; Wah Chu *et al.*, 2005). Bagging enhances progeny survival and dispersal (Chen & Caswell-Chen, 2003), however, in our experiment, progeny which hatched in parents never reached sexual maturity or switched to a dauer stage. Therefore, we can say that the attempt to rescue the progeny by bagging failed at higher U-concentrations. Below 1.14 mM U, populations seemed to have the ability to evolve very rapidly for all traits and at 1.14 mM U, individual brood sizes were extremely low at F2 compared to P0 generation (only 4%). Despite a short multigenerational experiment, our results show that it is possible in only three generations to highlight the importance of the strength of the environmental change on the capacity to cope this change by acclimation and if it is not possible, to require adaptation of the population.

## 5. Conclusion

After 4 days of U-exposure at P0 generation, our results showed that *C. elegans* individuals were on average smaller, slower, less fertile, and developed less fast than the controls. Across generations, phenotypic changes can vary in amplitude and in direction, depending on the concentration of U-exposure. This may be explained by the differential effects of development plasticity, selection pressures, and evolutionary responses of the traits to U-toxicity. Our results emphasize the need for multigenerational tests for accurate assessment of the environmental risks of U pollution on population dynamics in contaminated environments.

## Acknowledgments

The strain used in this work was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). We especially thank Simon Descamps for his patience in teaching us how to handle the strain of *C. elegans*, Sandrine Pereira for her suggestion of using HEPES buffer and Virginie Camilleri for technical assistance with the ICP-AES measurements. This work was part of the Envirhom-Eco research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.



## ARTICLE II

### POLLUTION BREAKS DOWN THE EXPRESSION OF GENETIC STRUCTURE OF LIFE HISTORY TRAITS IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Morgan Dutilleul, Benoit Goussen, Jean-Marc Bonzom, Simon Galas, Denis Réale.  
Submitted to Journal of Evolutionary Biology

#### Abstract

When pollution occurs in an environment, the populations present suffer numerous negative and immediate effects on their life history traits. Their evolutionary potential to live in a highly stressful environment will depend on the strength of selection pressures but also on the genetic structure: the heritability of the traits and genetic correlations between them. If expression of this structure can change in a stressful environment it becomes necessary to quantify these changes in order to estimate the evolutionary potential of the population in this novel environment. We studied the genetic structure for survival, fertility, early, and late growth in isogenic lines of a *Caenorhabditis elegans* population subject to three different environments: a control environment and two polluted environments, one with uranium and the other with a high salt concentration. We found a decrease of heritability in polluted environments for fertility and early growth, two traits that were the most heritable in the control environment. The expression of genetic structure of traits was particularly altered in uranium, probably due to extremely low heritabilities in this environment. Hence this could prevent selection from acting on traits despite the strong selection pressures exerted on them. Moreover the decrease in heritability was not linearly correlated to the fitness reduction in polluted environments since the effects on phenotypic traits in the salt environment were stronger than in uranium. Our results suggest that pollution can alter the expression of the genetic structure of a *C. elegans* population, and thus modify its evolutionary potential.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*; isogenic lines; heritability; genetic correlations; uranium; pollution

## 1. Introduction

Anthropogenic activities can disturb biological functions. In particular, environmental pollutions entail stress on the population with negative consequences on individuals' life history and fitness, and on the demography of the population. However, individuals may not be affected in the same way according to their genotypes and phenotypes (Hoffmann & Parsons, 1991 ; Posthuma & Van Straalen, 1993). Pollution can thus create differential survival and reproductive success, which in turn can lead to microevolution in populations (Medina *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007). The evolutionary potential of life history traits depends on the strength of selection pressures acting on each of these traits in the population, their level of additive genetic variation, as well as the magnitude and sign of their genetic associations (Lande & Arnold, 1983 ; Falconer & Mackay, 1996 ; Roff, 2002b). The two latter are included in the matrix of additive genetic variance and covariance (**G**) (Lande, 1979). The **G** matrix reflects the evolutionary constraints on independent evolution of traits imposed by pleiotropy or linkage disequilibrium. An estimation of the **G** matrix is thus a necessary step towards the estimation of a population's evolutionary potential (Cheverud, 1984 ; Roff, 2002b).

Evolutionary change in quantitative traits can be described by the multivariate extension of the breeder's equation (Lande, 1979 ; Lande & Arnold, 1983). This equation is applicable only under the assumption that the **G** matrix is stable over time and across environmental conditions. Theoretical and empirical investigations revealed a strong **G** matrix stability through time (Arnold *et al.*, 2008), even despite climate change for example (Garant *et al.*, 2008), but others demonstrated that the stability of the **G** matrix can be altered (Steppan *et al.*, 2002 ; McGuigan, 2006 ; Doroszuk *et al.*, 2008), even following short-term environmental changes (Bégin *et al.*, 2004 ; Sgrò & Blows, 2004). Moreover, changes in environmental conditions may not only affect the additive genetic



and environmental variance of traits (Hoffmann & Merilä, 1999 ; Charmantier & Garant, 2005) but also their covariance (reviewed by Sgrò & Hoffmann, 2004). These studies contradict the hypothesis of a stable G matrix even over short time periods. Furthermore, under harsh environmental conditions, a decrease in the genetic variance of traits may reduce the adaptive potential of populations despite strong selection pressures occurring in this type of environment, and may thus prevent microevolutionary changes (Blows & Hoffmann, 2005 ; Wilson *et al.*, 2006). Therefore, using information on the G matrix in one particular set of environmental conditions to predict the evolutionary potential of a population under rapid environmental changes may be questionable. Indeed estimating the G matrix in the novel environmental conditions may be the only way to estimate a population's evolutionary potential. This is particularly important for studies that estimate the evolutionary consequences of novel and fast environmental changes caused by anthropogenic effects, such as the effect of pollutants (Coutellec & Barata, 2011). In this paper, we use a quantitative genetic approach to test the hypothesis that the G matrix for life history traits remains stable in a population of *Caenorhabditis elegans*, subject to different pollutants.

We chose to work on the effects of two pollutants, uranium and a high salt concentration, known to affect differently *C. elegans*. High salt exposure is an extreme hypertonic stress that provokes a rapid loss of water and solute content in cells. *C. elegans* attempts to regulate this loss by the biosynthesis of glycerol through transcriptional upregulation of an enzyme (*gpdh-1*) in the intestine and hypodermis, which is in direct contact with the external medium (Lamitina *et al.*, 2004 ; Lamitina *et al.*, 2006). However several other genes, such as heat shock, cytoskeletal and trehalose biosynthesis also regulate hypertonic stress (Lamitina & Strange, 2005). Uranium is a heavy metal which has higher chemotoxic than radiotoxic effects because of its low specific activity (Kuhne *et al.*, 2002). Uranium

affects severely the intestinal epithelium in earthworm *Eisenia fetida* (Giovanetti *et al.*, 2010). The presence of uranium in the environment of *C. elegans* increases *mtl-1* expression, which interferes with U-accumulation in cells; probably by sequestration and transport of uranium outside the cells (Jiang *et al.*, 2009).

Because of its short life cycle and ease of handling, *C. elegans* is a model of growing interest to study quantitative genetic parameters (Braendle *et al.*, 2008). For example, the genetic correlation structure of life history traits estimated from recombinant inbred lines differ between high and low food density (Harvey *et al.*, 2008) and low and high temperature (Gutteling *et al.*, 2007), at levels that are known to stress *C. elegans*.

In this paper we use the isofemale line method (David *et al.*, 2005), to analyse the changes in the expression of genetic structure of life history traits a *C. elegans* population in a control environment and in two environments polluted with uranium or a high salt concentration. Life history traits are directly involved in the demographic response of a population to any rapid environmental change and they generally encompass many other traits that can affect both survival and reproduction. Working on life history traits gives us a broad picture of the evolutionary response of an organism to changing environmental conditions. Furthermore, in the absence of detailed mechanisms of resistance of *C. elegans* to both salt and uranium, life history traits were good candidates to examine what type of response this organism could show in these novel environmental conditions. Our hypotheses were: (i) that a genetic structure (i.e. heritability and genetic correlations) exists between traits in the three different environments; and (ii) that the expression of this structure can be altered in the polluted environments compared to the control environment, because of drastic changes in environmental conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Isofemale line technique

In this study we applied the isofemale line technique (ILT), commonly used on wild populations of *Drosophila* sp. (review by David *et al.*, 2005). The relationship between narrow-sense heritability ( $h^2$ ) and the coefficient of intraclass correlation ( $t$ , provided by ILT), is not so obvious but  $t$  does give a better heritability estimate than the half-sib design or the parent-offspring regression method. For example, the technique provides measures of about  $95 \pm 15\%$  of the heritability for morphometric traits in natural population of *D. melanogaster* (David *et al.*, 2005), thus yielding a close estimation of additive genetic variance. It is a useful tool to rapidly estimate genetic variability and genetic correlation of traits and to compare these genetic parameters between different traits and different environments (or even different populations). Furthermore, ILT can be easily applied to *C. elegans* because of its androdioecious breeding system (i.e. self-fertilization of hermaphrodites and facultative outcross with males). Indeed after mating, each isogenic line can be conserved as an inbred line. To facilitate reading, the term heritability was used throughout the text instead of the coefficient of intraclass correlation.

### 2.2. Nematodes culturing

Here, we used a stock population of *C. elegans* composed of a mixture of 16 wild isolates (Teotónio *et al.*, 2012) in order to obtain a large genetic diversity. The population, composed of more than 30% of males, was maintained in laboratory conditions during 140 generations, where recombination-selection equilibrium was mostly achieved without significant loss of genetic diversity (Teotónio *et al.*, 2012). However, we used

different laboratory conditions for our needs. We used 500 individuals in a 9 cm diameter Petri dish with NGM-modified agar (use of HEPES buffer, article I). We produced six replicated experimental populations. Plates were seeded with 1 ml of a 20:1 mixture of *Escherichia coli* strain OP50 ( $OD_{600nm}$  of 3) as the food source. Every 3 days we washed the nematodes (about 20,000 individuals) off the plates with an M9-modified solution (use of HEPES buffer) for each replicate and kept each replicate in 15 ml falcon tubes. The number of individuals in a tube was estimated with five sample drops of 5  $\mu$ l, following Teotónio *et al.* (2012), and then the volume corresponding to 500 individuals, from all developmental stages, was placed in a fresh Petri dish. Nematodes were cultured throughout the experiment at 20°C and 80% RH.

### 2.3. Creation of lines

After repeating this protocol about forty times ( $\sim 40$  generations despite the discrete overlapping of developmental stages), we selected 100 gravid hermaphrodites, and placed them on a new Petri dish, for each of the six replicates. Potential evolutionary changes caused by such changing conditions, should be similar in both the treatment and control environments. We allowed the hermaphrodites to lay eggs for a 2-hour period, and then transferred approximately 200 embryos on a new Petri dish (200 embryos per replicate). After 40 hours, when sexual differentiation is visually possible but individuals are not yet mature (i.e. L3 larval stage; Sulston *et al.*, 1980), we randomly picked a single hermaphrodite and a single male, from different Petri dishes, and placed them separately (by couples) in 6 well tissue-plates. We created 14 couples. NGM in wells were seeded with 150  $\mu$ l of a 5:1 mixture of OP50. After leaving plates in a laminar flow hood one hour to allow them to dry, plates were then top-exposed to UV doses for 90 s to stop bacterial growth (Bio-Link Crosslinker;  $\lambda=254$  nm; intensity = 200  $\mu$ watt.cm<sup>-2</sup>). The



main aim of this UV treatment was to avoid different bacterial growth in control and polluted plates. Reproduction by mating produces a high frequency of male in the progeny, whereas hermaphrodite self-fertilization produces only 0.1% of males (Ward & Carrel, 1979 ; Prahlad *et al.*, 2003 ; Teotónio *et al.*, 2006). Therefore, 72 hours after the separation of the couple, we checked if the ratio of males and hermaphrodites in the progeny was approximately 1:1, to guaranty that mating between the hermaphrodite and the male was successful. We then picked one L3 stage hermaphrodite in each of the progeny of 14 couples to initiate 14 isogenic lines. This was done 72 hours after couple creation to avoid the risk of self-fertilization that could occur within the few hours after mating (Hart, 2006). Each line reproduced by self-fertilization for two generations in a 6 cm Petri dish, composed of the same environment as presented above.

#### 2.4. Contamination design and measurement of traits

At the second generation of self-fertilization, we transferred 20 gravid hermaphrodites of each line in a new Petri dish. We considered this moment as  $t = 0$ . After 2 hours of egg-laying, eggs were individually placed in 12-well of a tissue culture plate. Twelve eggs per line and per environment were placed in three different NGM media: control, uranium (addition of 1.1 mM U) and high salt concentration (addition of 308 mM NaCl). Wells were seeded with 75  $\mu$ l of a 5:1 mixture of OP50 (same UV treatment as for 6-well plates). In our experiment, the term “isogenic” does not correspond exactly to our lines, as there is heterozygosity in this population (Teotónio *et al.*, 2012). However, individuals have reproduced twice by self-fertilization before the experiment; we thus expected a high reduction of heterozygosity (Hedrick, 1980 ; Reed & Frankham, 2003 ; Honnay *et al.*, 2007).

Individuals growing in salt showed a slower development than in the control and in uranium. Therefore, individuals were transferred twice into a new well at 96h in the control and uranium environment or 168h in the salt environment and then again 36h later. Hatched progeny were counted the day following each transfer to measure brood size, an index of fertility. We photographed individuals using a stereomicroscope (Olympus SZX12, 1.6 x 90 magnification) with a computer-connected camera (Nikon D5000). Using a micrometer scale measure and ImageJ software (Rasband, 2012), body length was measured at 72 and 144h. These two hours correspond approximately to the population's onset and to the end of the egg-laying period in a control environment, respectively (*pers. obs.*). These two measures will be called early growth and late growth thereafter. Survival was estimated by counting the number of parental individuals still alive at 144h.

## 2.5. Genetic parameters estimation

We estimated the genetic parameters by using a Bayesian model approach in the MCMCglmm package for generalized linear mixed-effects model (Hadfield, 2010) in the R software (R Development Core Team, 2012). We fitted multivariate generalized linear mixed-effects models for different traits within the same environment (a quadrivariate model per environment) and for the same trait across different environments (a trivariate model per trait). So, models did not contain fixed effects but we included lines as random effects in order to estimate between- and within-line variance (respectively  $V_b$  and  $V_w$ ) for each trait. We modelled the survival with a binary error structure and a Gaussian one for the other traits. Expanding the binomial data into binary data allows us to fit a model in which we can estimate the correlation between survival and the others traits. Estimations were generated by a Bayesian approach to obtain the entire posterior

distributions of (co)variance matrices of traits rather than only point estimates. To avoid any biased results caused by the fact that traits differ in their means, we rescaled the traits prior to analysis by dividing the mean by twice its standard deviation (Gelman, 2008). After several priors tested, we retained proper prior ( $nu = k - 1 + 0.002$ ) with a very low variance parameter ( $V = \text{diag}(k) * V_p * 0.05$ ), where  $V_p$  is the phenotypic variance,  $k$  the dimension of  $V$  (i.e. number of traits). There is one exception for survival for which we fixed the environmental (also called residual) variance to 1. For multivariate analyses with four different traits we allowed models to estimate different random and environmental variances, and covariances between the pairs of traits. In the models analysing the same trait across the three different environments, traits were measured on different individuals, and we thus fixed the environmental covariance to zero (see appendix C Table C1 for comparison of models with or without genetic covariance between traits allowed in prior). Despite the use of slightly informative priors used in the models, starting with low variance and any kind of covariance allowed us to say that the generated (co)variances were tangible. After verifying the convergence of parameters values (i.e. number of iterations, burn-in phase and thinning) and autocorrelation issues, we retained 2 500 000 iterations with a burn-in phase of 500 000, for a total of 1 000 samples for each analysis (Hadfield, 2010).

We estimated heritability in the multivariate models for traits within environments using  $t = nVb / (nVb + (n - 1)Vw)$ , where  $n$  was the number of lines (David *et al.*, 2005). Following David *et al.* (2005) we also estimated genetic correlations without correcting for variance and covariance within-line, although  $n$  was less than 20. Using this correction would generate, posterior distribution for correlations containing values greater than 1. We used the posterior mode of the distribution of heritability, genetic and phenotypic correlations as quantitative genetic parameter estimates. For each trait we also estimated



phenotypic ( $V_P = V_W + V_G$ ), environmental ( $V_E = V_P - V_G$ ) and genetic variances ( $V_G = tV_P$ ) and genetic covariance (Cov) between traits was calculated as  $\text{Cov}_{1,2} = r_G \sqrt{V_{G1} V_{G2}}$ , where  $r_G$  corresponds to genetic correlation between traits 1 and 2 and  $V_{G1}$  and  $V_{G2}$  to the genetic variance for trait 1 and 2, respectively (see appendix C Figure C1). We considered that each estimate was significantly different from zero when its 95% Bayesian posterior intervals of highest density (HPDIs) did not include zero. We also tested the differences of an individual's traits and genetic parameters in different environments. We considered differences to be significant between two environments when 95% HPDIs of subtraction between the posterior distributions of the trait in these two environments did not overlap 0.

### 3. Results

Phenotypic values for all traits were lower in the salt environment than in the uranium and the control environment (95% HPDIs of the subtraction did not include 0; Table 3). When compared to the control environment, fertility decreased by 55.0% in uranium and by 86.4% in the salt environment (95% HPDIs did not include 0). The same pattern was found for both early and late growths. Survival in the uranium environment was similar to that of the control environment (95% HPDI included 0), but it nearly halved in the salt environment.

Heritability estimates varied between 0.07 and 0.31 in the control environment and were significantly higher than zero for fertility and early growth only (Table 4A). In the uranium environment we found lower (i.e. 0.04 to 0.08) and non-significant heritabilities (Table 4B). In the salt environment heritability values varied between 0.07 and 0.27, but

were only significant for early growth (Table 4C). For fertility and early growth, heritability did not differ significantly between the control and the salt environments, but heritability in the control environment was higher than in the uranium environment (95% HPDIs did not include 0). Phenotypic variance for these two traits was reduced in both polluted environments compared to the control. However, in uranium, compared to the control, there was a stronger reduction of genetic variance than environmental variance (95% HPDIs did not include 0, Figure 15) which was directly related to lower heritabilities in this polluted environment (Table 4A, B). Phenotypic variance for fertility was twice as high in the control environment ( $V_p = 0.114$  [0.083; 0.180]) than in salt ( $V_p = 0.059$  [0.042; 0.086]) and three times higher than in uranium ( $V_p = 0.040$  [0.034; 0.054], Figure 15A and see also appendix C Figure C3 for representation of phenotypic correlation structures). The difference was less pronounced for early growth but also significant (Figure 15B).

Table 3. Average trait values of 14 isogenic lines of *C. elegans* in the control, the uranium and in the salt environment.

Fertility is measured by the number of eggs of a hermaphrodite. Early and late growth is measured as the increase in total length (in  $\mu\text{m}$ ) between 0 to 72h and 72 to 144h respectively. Significant differences corresponded to 95% intervals of highest posterior density of subtraction between the posterior distributions of a trait in two environments that do not overlap 0, and are represented by different superscript letters.

| Environnement | Mean $\pm$ sd                 |                                |                                | Percentage        |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
|               | Fertility                     | Early growth                   | Late growth                    | Survival at 144h  |
| Control       | 173.8 $\pm$ 43.5 <sup>a</sup> | 953.1 $\pm$ 131.3 <sup>a</sup> | 345.7 $\pm$ 106.9 <sup>a</sup> | 80.9 <sup>a</sup> |
| Uranium       | 78.2 $\pm$ 26.4 <sup>b</sup>  | 721.5 $\pm$ 108.8 <sup>b</sup> | 184.2 $\pm$ 100.1 <sup>b</sup> | 88.8 <sup>a</sup> |
| Salt          | 23.6 $\pm$ 34.1 <sup>c</sup>  | 223.2 $\pm$ 79.6 <sup>c</sup>  | 127.2 $\pm$ 121.0 <sup>c</sup> | 46.5 <sup>b</sup> |

We found moderate phenotypic correlations between traits in the three different environments (Table 4). In all environments, individuals that had a higher fertility also

had a stronger early growth and better survival. The phenotypic correlation between early and late growths was negative in the control and in uranium but positive in salt. In the control environment, fertility and early growth were positively genetically correlated, but these two traits were negatively correlated to the late growth. The range of these correlations was strong ( $> 0.75$  in absolute value, Table 4A). Moreover, the genetic correlation between fertility and late growth was hidden since phenotypic correlation was non-significant. However the environmental correlation ( $r_e$ ) was opposite in sign but non-significant ( $r_e = 0.100 [-0.128; 0.300]$ , see appendix C Table C2 for environmental correlations). In turn, we did not detect any genetic correlation in uranium. In particular, posterior modes for genetic correlation between fertility and growth traits are close to 0 ( $-0.023$  and  $-0.063$ , Table 4B). We found strong genetic correlation for the same combination of traits in salt and in the control (Table 4C) but with changes of sign for the correlation involving late growth due to the change of genetic covariance signs (see appendix C Figure C1 for genetic covariances between traits). We did not find any significant genetic correlation involving survival in all three environments (Table 4). For phenotypic correlations that were not detected at the genetic level, environmental correlations were significant (see appendix C Table C2).

We found a positive and significant genetic correlation between the control and the uranium environment for fertility (Table 5), indicating a genetic dependence across environments. We also found a positive correlation for late growth across these two environments and a negative one for early growth between the two polluted environments despite a slight overlap of 0 for 95% HPDIs. Because of a potential lack of power, we did not present cross-environment genetic correlations for survival.

Table 4. Matrices of heritabilities (diagonal), phenotypic (below the diagonal) and genetic correlations (above the diagonal).

Parameters with their 95% intervals of Bayesian credibility, for traits measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment. Values in bold are significant estimates.

| A            | CONTROL | Fertility                    | Early growth                 | Late growth                  | Survival                     |
|--------------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Fertility    |         | <b>0.249 [0.036; 0.525]</b>  | 0.904 [0.361; 0.965]         | -0.912 [-0.987; -0.450]      | 0.924 [-0.520; 0.985]        |
| Early growth |         | 0.543 [0.345; 0.718]         | <b>0.314 [0.105; 0.608]</b>  | -0.780 [-0.967; -0.188]      | 0.930 [-0.279; 0.991]        |
| Late growth  |         | -0.154 [-0.427; 0.093]       | -0.299 [-0.566; -0.101]      | <b>0.110 [-0.009; 0.424]</b> | -0.839 [-0.978; 0.588]       |
| Survival     |         | 0.695 [0.454; 0.881]         | 0.346 [-0.007; 0.673]        | 0.132 [-0.310; 0.553]        | <b>0.073 [-0.087; 0.394]</b> |
| B            | URANIUM | Fertility                    | Early growth                 | Late growth                  | Survival                     |
| Fertility    |         | <b>0.089 [-0.176; 0.353]</b> | -0.023 [-0.635; 0.693]       | -0.063 [-0.683; 0.784]       | 0.371 [-0.691; 0.863]        |
| Early growth |         | <b>0.607 [0.485; 0.699]</b>  | <b>0.042 [-0.073; 0.122]</b> | -0.521 [-0.835; 0.637]       | -0.401 [-0.869; 0.717]       |
| Late growth  |         | 0.140 [-0.031; 0.326]        | -0.347 [-0.479; -0.125]      | <b>0.034 [-0.059; 0.241]</b> | -0.720 [-0.948; 0.749]       |
| Survival     |         | 0.736 [0.411; 0.852]         | 0.512 [0.062; 0.724]         | 0.208 [-0.372; 0.576]        | <b>0.088 [-0.089; 0.154]</b> |
| C            | SALT    | Fertility                    | Early growth                 | Late growth                  | Survival                     |
| Fertility    |         | <b>0.186 [-0.034; 0.442]</b> | <b>0.896 [0.514; 0.987]</b>  | <b>0.774 [0.045; 0.966]</b>  | 0.892 [-0.804; 0.961]        |
| Early growth |         | <b>0.551 [0.392; 0.723]</b>  | <b>0.270 [0.001; 0.512]</b>  | <b>0.811 [0.188; 0.967]</b>  | 0.901 [-0.825; 0.973]        |
| Late growth  |         | <b>0.537 [0.340; 0.694]</b>  | <b>0.708 [0.584; 0.813]</b>  | <b>0.126 [-0.039; 0.363]</b> | 0.901 [-0.722; 0.967]        |
| Survival     |         | 0.404 [0.037; 0.742]         | 0.515 [0.144; 0.738]         | 0.725 [0.448; 0.880]         | <b>0.067 [-0.086; 0.217]</b> |

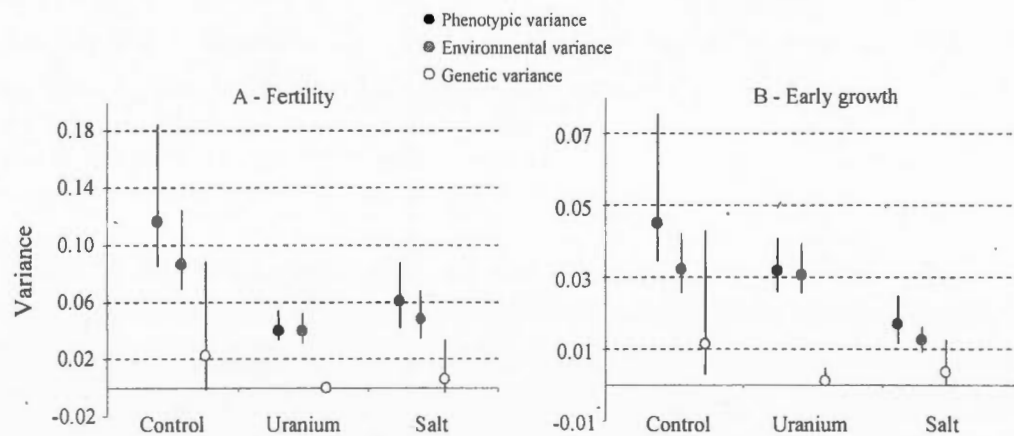


Figure 15. Variance estimates with their 95% intervals of Bayesian credibility, for fertility (A) and early growth (B) measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment.

Phenotypic variance ( $V_P$ ) is decomposed in environmental ( $V_E$ ) and genetic variances ( $V_G$ ). Estimates were obtained using multivariate models for different traits within the same environment (see appendix C Figure C2 for late growth).



Table 5. Cross-environment genetic correlations.  
Parameters with their 95% intervals of Bayesian credibility, for traits measured on *C. elegans*.

|                 | Fertility              | Early growth           | Late growth           | Survival               |
|-----------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Control-Uranium | 0.718 [0.024; 0.968]   | 0.438 [-0.478; 0.838]  | 0.833 [-0.049; 0.954] | 0.978 [-0.967; 0.998]  |
| Control-Salt    | 0.444 [-0.585; 0.787]  | 0.087 [-0.473; 0.716]  | 0.554 [-0.488; 0.900] | 0.967 [-0.940; 0.996]  |
| Uranium-Salt    | -0.070 [-0.746; 0.721] | -0.811 [-0.943; 0.076] | 0.625 [-0.292; 0.942] | -0.943 [-0.999; 0.929] |

#### 4. Discussion

Previous theoretical and empirical investigations have shown differences in the expression of genetic structure of morphological and life history traits between stressful and control environments (Hoffmann & Merilä, 1999 ; Roff, 2002b ; Charmantier & Garant, 2005). Here we show that living in a polluted environment can decrease both genetic and environmental variances. Yet the stronger reductions of genetic variance rather than environmental variance explained the reductions in heritability. Heritability for fertility and early growth were lower in uranium than in salt, despite the stronger effects of the salt environment on phenotypic traits. Concerning changes of heritability in uranium, we found no genetic correlations contrarily to the salt and control environments. There were strong genetic correlations between fertility, early and late growth in control and salt but changes of sign for correlations involving late growth in salt. Cross-environment, there was a positive genetic correlation between control and uranium environment for fertility and probably also for late growth. Between uranium and salt environments, there was a negative genetic correlation for early growth.

Heritability ( $t$ ) from our experiment did not only yield additive genetic variance probably because there is a large amount of epistatic interactions due to the experimental bottleneck, linked to the foundation of lines, as David *et al.* (2005) explained. This

additional effect would be cryptic in a large panmictic population. Other quantitative genetic designs may not suffer from that issue. For example, an ‘animal model’ (Kruuk, 2004) using complete information on a pedigree can provide very appropriate estimates of quantitative genetic parameters. However, it is almost impossible to build up a pedigree for *C. elegans*, a species for which we cannot differentiate between individuals without separating them, as in our experiment. For the same reasons and the difficulties to control for all the offspring if they come from outcrossing or self-fertilization, it is very hard to create a half-sib/full-sib design experiment in this species. Besides, ILT has been shown to provide a better estimation of heritability than the parent-offspring regression method (Bubliy *et al.*, 2001). Therefore, ILT remains a very appropriate and convenient approach to quantitative genetic analyses in this species.

#### 4.1. Effects on heritability

Compared to the other traits, survival heritability was absent or extremely low (thus difficult to detect) in the control environment. This may be due to its genetic regulation. Survival is regulated by a few genes of large effects contrary to growth or reproductive traits which are regulated by many genes of small effects for which heritability increases (Hoffmann & Parsons, 1991 ; Barata *et al.*, 2002; in *C. elegans* Knight *et al.*, 2001). Heritabilities in the control environment were moderate for early growth and fertility and low for late growth. Gutteling *et al.* (2007) studied broad-sense heritability on recombinant inbred lines of *C. elegans* for body mass at maturation and fertility at different temperatures. Heritability was similar to that of our study for fertility but it was higher for growth. However the difference can be explained by the differences in temperature between our study (20°C) and theirs (12 and 24°C), which affects average growth and reproduction (Byerly *et al.*, 1976) as well as heritability (Gutteling *et al.*, 2007).



The decrease in heritability for early growth and fertility in both polluted environments is consistent with several laboratory or field studies, although some studies show the opposite response (reviewed by Hoffmann & Merilä, 1999 ; Charmantier & Garant, 2005). Heritability reduction could be caused by a decrease in additive genetic variance or an increase in environmental variance. Our results showed that both environmental and genetic variance were higher in the control, resulting in a decrease of phenotypic variance in both polluted environments (Figure 15). Despite the decrease in phenotypic variance, the reduction of heritabilities was mainly due to the reduction of (additive) genetic variance. Although a reduction of heritability is commonly caused by an increase in the environmental variance component, there can be cases where it results from a reduction of the genetic variance components (Charmantier & Garant, 2005). In this latter case, the decrease in heritability could be triggered by a limitation of the genetic potential due to constraining developmental conditions (Wilson *et al.*, 2006), e.g. despite strong additive genetic effects responsible for individual differences in body size, potential size may not be attained because of a stress-induced reduction of growth rate (Gebhardt-Henrich & Van Noordwijk, 1991).

Furthermore, heritabilities were extremely low in the uranium environment. In several studies, phenotypic variation in stressful environments seems to be rather related to the provided novelty (Holloway, 1990 ; Kristensen *et al.*, 2003). The original populations at the origin of the wild isolates used in our study may have experienced either similar stresses or different stresses affecting the same sets of genes as the uranium. Moreover evolutionary response of a trait to selection cannot occur in an environment where the trait heritability is null, no matter how strong selection pressures are. Wilson *et al.* (2006) showed a decrease of maternal genetic variance in a stressful environment for wild sheep although the strength of selection was strongly and positively correlated to the quality of

the environment. Cadmium (a heavy metal like uranium) induced reduction of broad-sense heritability in *Daphnia magna* at 20°C, but apparently this was mostly due to the decrease in dominance variance (Messiaen *et al.*, 2012). Nonetheless, Hendrickx *et al.* (2008) observed a strong decrease in heritability of growth in the wolf spider *Pirata piraticus* associated to a decrease in additive genetic variance in a cadmium environment, compared to the control. The authors proposed that the expression of growth in that species involved different sets of genes in the different environments. In a stressful environment, gene expression governing the traits can be masked by other alleles involved in detoxification (Hoffmann & Parsons, 1991). Indeed, for several heavy metals including uranium, resistance is due to one or a few major genes in *C. elegans* (Klerks, 2002 ; Aschner & Martinez-Finley, 2011), which could mask the genes' expression of quantitative traits such as life history traits. Nonetheless if heritability is only hidden but existent, selection may still act on it, thus more studies are required to confirm the effects of polluted environments on heritability reduction.

#### 4.2. Cross-environment genetic correlations

We detected cross-environment genetic correlations between control and uranium for fertility and apparently also for late growth. This indicated a partial overlap between the genes involved in the expression of these traits in both environments (Falconer & Mackay, 1996), despite different genetic variances between control and uranium. For other measures between control and the polluted environments, the 95% HPDI largely overlapped 0 and it is thus possible that the correlation is negligible or this result may be attributed to a potential lack of power related to the number of lines in our experiment. Given that our aim was only to detect the presence of negative genetic correlations rather than obtain an accurate measure of it, our method based on line mean was sufficient as it

generally produces lower correlations than other methods thus resulting in a more conservative estimate (see Astles *et al.*, 2006). All the posterior modes of correlations with the control environment are either positive or close to 0, implying that there is no trade-off for the measured traits between the uranium or salt environment and the control environment. Therefore, adaptation to uranium or to salt does not seem to be associated with a strong coevolution between environments for these traits in our experiment.

However, there was a negative genetic correlation for early growth between uranium and salt, which indicates a cost to adapting to the presence of one of these pollutants after adapting to the other. In their experimental evolution study, Lopes *et al.* (2008) found that once *C. elegans* was adapted to an environment polluted with a pesticide, there was no adaptation cost for reproduction in the control environment or an environment polluted with a second pesticide. Contrarily, Jansen *et al.* (2011) showed an adaptation cost, which was conditional on the novel environment for *D. magna* populations that were exposed to a pesticide. Adapted populations of *D. magna* suffered no costs in the control environment but were more parasitized, therefore suggesting a higher susceptibility of this population to other stresses. In contrast, adaptation costs to cadmium existed in the control environment, for growth in *D. magna* (Ward & Robinson, 2005) or fertility in *D. melanogaster* (Shirley & Sibly, 1999). The advantage of cross-environment estimates of genetic correlation to measure the potential adaptation cost to pollutants is that it can be performed over a short period compared to other approaches such as experimental evolution. The absence or presence of adaptation cost to pollutants revealed by this method, however, would need to be validated by direct multigenerational experiments of adaptation to uranium and salt, before one can generalize its appropriateness.

#### 4.3. Effects on genetic correlation structure

The strong genetic correlation in the control environment indicated a coevolution between growth and fertility (Table 4A). Genotypes that grew faster before sexual maturity (early growth) were more fertile but had a reduced late growth. This evolutionary strategy is generally that of small, short-lived organisms as *C. elegans* (r-selection, MacArthur & Wilson, 1967 ; Roff, 2002b). *C. elegans* produces juveniles as soon as possible (Hodgkin & Barnes, 1991). Sperm production takes place during larval stages and then stops at the molt, which produces the adults while the remaining germ line cells generate exclusively oocytes until the end of the egg-laying period (Antebi *et al.*, 1997). Investment in growth during the costly oocyte production affected directly fertility (Goranson *et al.*, 2005). Consequently, the likely outbreeding depression caused by the hybridization between diverse wild isolates (Dolgin *et al.*, 2007), to create the population used in our experiments, may be the cause of its low fertility (about 174 larvae in control, Table 3) compared to other populations of *C. elegans* (Hodgkin & Barnes, 1991). However, outbreeding depression happening at the construction of the *C. elegans* population, when the wild isolates were crossed, and did not break down the expression of genetic structure of the study population under stabilizing selection (Teotónio *et al.*, 2012).

Genetic correlations in the salt environment existed for the same combination of traits. When compared to the control, the changes in sign for correlations involving late growth in salt could be explained by a considerable developmental delay in this environment. Unlike in other environments, most individuals started laying eggs after 72h, and even after 144h (data not shown). So, we could say that early and late growths correspond to early growth in salt, and that the expression of genetic structure between growth and fertility is close to that of the control environment. In contrast, the genetic correlations



in the control became null in uranium, in particular those involving fertility. Interestingly in uranium the phenotypic correlations were similar than in the control environment, due to significant environmental correlations (see appendix C Table C2). It has even been shown that environmental correlations can have opposite signs than genetic correlations, in particular due to acquisition and allocation of resources for both traits (de Jong & Van Noordwijk, 1992 ; Roff, 2002b). Besides this could also explain, the presence of more significant environmental correlations in the stressful environment, in our study, where individuals have probably suffered from effects on resources acquisition and allocation (Lamitina & Strange, 2005 ; Jiang *et al.*, 2009 ; Giovanetti *et al.*, 2010) compared to the control. This highlights the importance of looking at the genetic structure: despite the same phenotypic structure in different environments, the expression of genetic structure may be broken down, implying a different evolution of life history traits (Willis *et al.*, 1991 ; Gibert *et al.*, 1998 ; Roff, 2002b ; Hadfield *et al.*, 2007).

Mechanisms of resistance, governed by gene expression, enable maintenance of individuals under highly stressful conditions such as pollution, but affect expression of genetic structure (Hoffmann & Parsons, 1991). Indeed Shirley & Sibly (1999) analysed the processes by which *D. melanogaster* increased its tolerance to cadmium. Apparently the links between genes involved in fertility, survival and development period in a control environment may be disrupted due to the addition, in the previous links, of resistance genes expressed in cadmium. It is also the case for natural birch-feeding insect, *Priophorus pallipes*; the genetic correlation between body size and development time was positive when quality of foliage resources were good and negative or close to zero for low resource quality (Kause *et al.*, 2001). Evolutionary trajectories depend on the effect of environmental conditions on organisms (Sgrò & Hoffmann, 2004). Hence, even if selection experiments in polluted environment require considering the temporal

heterogeneity of the **G** matrix, for example by emergence of trade-off (de Jong, 1995 ; Steppan *et al.*, 2002 ; Fuller *et al.*, 2005), we showed here that the expression of genetic structure is already changed when individuals are subject to sudden pollution. In contrast, a change in the genetic structure in the uranium environment, by selection on heterozygosity for example, is hardly possible given that mortality was similar in the uranium and the control environments. There are also different degrees of change, for uranium and salt, probably depending on their mode of action. Consequently, evolution of the **G** matrix is already affected from the moment pollutants appear in the environment. It should now be important to consider why some pollutants or specific genetic conditions promote stability or instability of the **G** matrix.

#### 4.4. Relation between heritability and fitness

Another important aspect of our result is that, when compared to the control, the decrease of heritability was higher in uranium than in the salt environment (Table 4) although salt concentrations used in our study affected more strongly the individuals' fitness (Table 3). Consequently, changes in heritability are more complex than a simple positive relation between stress effects and fitness reduction. The decrease of heritability in polluted environments may also depend on how interference disrupts gene expression (Medina *et al.*, 2007). However this needs to be clarified with studies that focus on heritability in different polluted environments with different concentration ranges of pollutant as well.



## 5. Conclusion

Isogenic lines of *C. elegans* allowed us to analyse in one generation the effects of pollutants on the expression of genetic structure of life history traits. Our findings confirm the decrease of heritability in polluted environments probably due to the expression of different sets of genes, such as resistance genes, that disrupt the expression of genetic structure, especially in sudden uranium pollution. Moreover the decrease of heritability is not linearly correlated to fitness reduction in polluted environments. The extremely low heritability in uranium could prevent selection to act despite strong selection pressures on traits. Finally, when individuals are adapted to one polluted environment, there seems to be a genetic cost to living in the other polluted environment. Pollution can break down the expression of genetic structure of life history traits of a population of *C. elegans* upon arrival in its environment, and thus affect its evolutionary potential.

## Acknowledgments

We thank R. Beaudouin, M. Gauduchon, R. Gilbin, C. Lecomte, P. Peres-Neto, G. Stora, and J. Verreault for discussions at the early stage of this project. We are also very grateful to H. Teotónio for providing us with his base population and for giving us helpful comments, E. Milot for helping us with Bayesian analyses, C. Pasquaretta for his support in R coding, and C. Grou for linguistic corrections. This work was part of the Envirhom-Eco research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

### ARTICLE III

## MULTIVARIATE ANALYSES OF EVOLUTIONARY CHANGES IN LIFE HISTORY TRAITS OF A *CAENORHABDITIS ELEGANS* POPULATION EXPOSED TO POLLUTION

Morgan Dutilleul, Jean-Marc Bonzom, Catherine Lecomte, Benoit Goussen, Fabrice Daian, Simon Galas, Denis Réale. *Evolution*. In prep

### Abstract

Because of their strong intensity of selection, some anthropogenic disturbances force populations to evolve rapidly to resist. However, these environmental changes can also alter the genetic structure of traits, acting on the evolutionary potential of traits. Thus, assessing the effects of pollutants on evolutionary response and genetic structure is important to our understanding of mechanisms entailing specialization or resistance to environmental changes. In this study, we used an experimental evolution approach where we exposed *Caenorhabditis elegans* to uranium, salt and alternating uranium and salt environments during 22 generations. At several generations, we measured individual traits, in particular fertility and growth. Moreover, we evaluated the phenotypic (and potentially genetic) pattern of traits (co)variance through generations in uranium and salt environments. We showed a reduction of the stability of the structure of traits in uranium environment and a higher capacity to response by acclimation, opposed to the results in salt environment. Consequently, the evolutionary responses of traits were generally higher in salt than in uranium. Furthermore, in alternating environment the populations had the strongest evolutionary response for fertility. Thus, the selection of a generalist type did not entail a reduction of resistance for both pollutants. With this multigenerational experiment, we confirmed in *C. elegans* that the effects of pollutants on the evolutionary potential of traits can be extremely fast.

**Keywords:** experimental evolution; evolutionary response; phenotypic (co)variance; local adaptation; evolution of generalism; *Caenorhabditis elegans*; pollution; uranium

## 1. Introduction

During the last few decades numerous studies have highlighted the important role of anthropogenic disturbances on the occurrence and speed of contemporary microevolutions in wild populations (reviewed by Hendry & Kinnison, 2001 ; Medina *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007 ; Hendry *et al.*, 2008). For example, studies have reported cases of increased resistance to heavy metals or pesticides in less than twenty generations in response to strong selection pressures (e.g. Antonovics *et al.*, 1971 ; Klerks & Levinton, 1989 ; Powles *et al.*, 1998 ; Beaudouin *et al.*, 2012).

Speed of evolutionary response is assumed to depend on both the intensity of selection pressures and the level standing genetic variation for the trait under selection (Falconer & Mackay, 1996). However, populations can take different evolutionary trajectories in response to the same novel selection pressures. For instance, in response to a pollutant energy allocation can change to favour detoxification mechanisms (Kraaijeveld & Godfrey, 1997 ; Burdon & Thrall, 2003). Alternatively, the pollutant may affect the evolution of life history characteristics, with an evolution towards faster growth that cause a reduction of the internal concentration of the pollutant (Sibly & Calow, 1989). Furthermore, evolution experiments placing populations in presence of a pollutant over multiple generations have shown that after an early quick drop fitness can increase in as fast as six generations (Xie & Klerks, 2003 ; Ward & Robinson, 2005 ; Salice *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b). These results indicate that at least in these conditions populations can show quick evolutionary response to selection in a novel environment.

Selection induced by pollutants is generally directional, continuous, and strong (Posthuma & Van Straalen, 1993 ; Medina *et al.*, 2007). Nonetheless, wild populations

affected by pollution generally live in heterogeneous environments where different selection pressures can act on the organism in different directions (Levins, 1968 ; Hedrick, 1974, 1976, 1986). These differential selection pressures have been shown to help maintaining genetic variation in population, from both a theoretical (Haldane & Jayakar, 1963 ; Gillespie & Turelli, 1989 ; Hedrick, 1995) and empirical point of view (Mackay, 1981 ; Hedrick, 1986 ; Gram & Sork, 2001 ; Roff, 2002b). Furthermore, temporally fluctuating environments seem to favour a generalist rather than a specialist way of life (Reboud & Bell, 1997 ; Cooper & Lenski, 2000 ; Turner & Elena, 2000 ; Cooper & Lenski, 2010). In such a case, populations evolving in an alternating presence of stressors in their environment may cope less with each stressor, and their evolutionary response may be slower, than that of populations that have evolved in response to only one of the stressors. To validate these hypotheses we explore the speed of evolutionary response to selection in populations of *Caenorhabditis elegans* subject to only one type of pollutant or to alternating pollutants in their environment.

An organism can be viewed as an integrated system with functional, developmental, and genetic associations among its different traits (Pigliucci, 2003). Therefore not taking into account the different traits involved in the adaptation of the population facing novel selection pressure can bias the prediction of its evolutionary trajectory (Schluter, 1996 ; Bégin & Roff, 2003). In other words, the evolutionary potential of a group of traits is constrained not only by the additive genetic variation of each trait and the strength of selection pressures acting on them, but also by the magnitude and sign of their genetic associations (Lande & Arnold, 1983 ; Falconer & Mackay, 1996 ; Roff, 2002b). These variances and covariances are included in the **G** matrix of additive genetic variance and covariance (Lande, 1979).



G matrices can be highly stable through time (Arnold *et al.*, 2008 ; Garant *et al.*, 2008), although several studies have shown that its stability can be altered (Maynard Smith, 1989 ; Steppan *et al.*, 2002 ; McGuigan, 2006 ; Doroszuk *et al.*, 2008 ; Berner *et al.*, 2010), and at the extreme following short-term environmental changes (Bégin *et al.*, 2004 ; Sgrò & Blows, 2004). The evolutionary trajectory will depend on diverse aspects of the matrix structure such as its temporal stability and the level of traits (co)variance (Jones *et al.*, 2003 ; Berner *et al.*, 2010). To our knowledge, multivariate analyses of microevolution event in response to a pollutant have not been studied yet, and one of our previous studies has shown that pollutants could highly alter the stability of the **P** and **G** matrices (article II). We proposed here to study experimentally the evolutionary changes occurring in the phenotypic structure of life history traits in *C. elegans* subject to different polluted environments. Although, The phenotypic structure does not always reflect the genetic structure appropriately (Reff, 2002a), in an experimental context where novel environmental conditions are controlled for, we can assume that after four generations in the same environment within- and cross-generation phenotypic plasticity are stable over time (Scheiner, 1993 ; Mousseau & Fox, 1998 ; Räsänen & Kruuk, 2007). Consequently, changes from one generation to another observed at the phenotypic level essentially reflect changes at the genetic level.

In the present study, our goal was to evaluate the evolution of life-history traits in *C. elegans* populations in response to pollution. This nematode is a good model to perform microevolution experiment because of its short life cycle, its small body length and its great ease of handling (Braendle *et al.*, 2008). Our approach allowed us to provide novel results on: (i) the degree of evolutionary response to selection of life history traits in a genetically diverse population of *C. elegans*, leading to differential increased resistance for two different constants pollutions (i.e. uranium or high salt concentration) and to

alternating uranium and salt pollution, and (ii) the evaluation of the changes in the phenotypic/genetic structure over time in these polluted environments.

## 2. Material and methods

### 2.1. Population maintenance

We worked with a stock population of *C. elegans* composed of a mixture of 16 wild isolates (Teotónio *et al.*, 2012) to obtain a large genetic diversity. The population was kept in the experimental conditions described in Teotónio *et al.* (2012) for over 140 generations, prior to our study, where recombination-selection equilibrium was mostly achieved without significant loss of genetic diversity. The population was composed of around 30% of males for an androdioecious breeding system (i.e. self-fertilization of hermaphrodites and facultative outcross with males). For our study we changed laboratory conditions: we used 500 individuals in a 9 cm diameter Petri plate (6 replicates) with NGM-modified agar (use of HEPES buffer, see article I). Once NGM was dispensed into Petri plates, plates were left in a laminar flow hood one hour to dry NGM. We also grew *E. coli* OP50 cultures in Lysogeny Broth (LB) rich medium at 37°C overnight. To avoid interaction between LB and uranium in the future U-treatment, we systematically centrifuged bacteria twice, removed the supernatant and re-suspended bacteria with a solution of 85 mM NaCl to obtain a 20:1 mixture of *E. coli* ( $OD_{600nm}$  of 3 in LB). Plates were seeded with 1 ml of this food source and left in a laminar flow hood for one hour to allow the bacterial culture to dry. Then plates were top-exposed to UV doses for 90 s to stop bacterial growth (Bio-Link Crosslinker;  $\lambda=254$  nm; intensity = 200  $\mu\text{watt.cm}^{-2}$ ). The main aim of this UV treatment was to avoid different bacterial growth in control and polluted plates.



Every 3 days we washed twice the nematodes off the plates with 3 ml of M9-modified solution (use of HEPES buffer) for each replicate and kept a sample per replicate in 15 ml falcon tubes. The number of individuals in a tube was estimated with five sample drops of 5  $\mu$ l (see Teotônio *et al.*, 2012), and then the volume corresponding to 500 individuals, from all developmental stages, was placed in a fresh Petri plate. This was done to transfer a representative sample of the age structure of the population at each time and avoid unintentional selection of some specific life history strategies. Nematodes were cultured throughout the experiment at 20°C and 80% of relative humidity.

## 2.2. Conditions of pollution

After repeating this protocol forty times (i.e. for about 40 generations), the individuals from the six replicates were mixed before transferring, in four different conditions, 500 individuals per plate (six plates per condition). We maintained the novel populations in similar conditions than previously but changed the medium depending on the four conditions of the experiment: (1) a control environment (see above for medium) and three stressful environments, identical to the control, except for the addition in the NGM-modified agar of (2) 1.1 mM U (uranyl nitrate:  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich, France), (3) 308 mM NaCl or (4) alternating uranium and salt at each generation (in the same conditions as for treatment 2 and 3 and salt for odd generations). Thereafter we will refer to different population evolving in these environments as control, uranium, salt and alternating populations. Uranium and salt concentrations were chosen because they entailed a reduction of fertility by 60% at the first generation of exposition corresponding to a strong selection. In all medium we added 51 mM NaCl as in the classical preparation of NGM (Stiernagle, 2006), except in the salt environment where

NaCl-concentration was of 308 mM. In the U-treatment, we also added the volume to obtain a concentration of 1.1 mM U (depending on volume of U-medium to prepare at each generation) of a solution of 50 mM U in NGM still liquid after autoclave. This multigenerational experience of selection lasted 66 days and approximately 22 generations (i.e. one generation per three days).

### 2.3. Traits measurements

During the first four generations we quantified the effects of within-individual and cross-generation phenotypic plasticity by measuring the traits at each generation. We then measured traits once every three generations until generation 22, except for generation 20 during which - for logistical reasons - we did the measurements instead of generation 19. Populations experienced longer generation time in salt, but to simplify we considered a 3-days generation time for all the treatments thereafter.

At any given generation, after transferring into a novel 6 cm diameter Petri plate the 500 individuals needed for the next generation, we sampled approximately 200 individuals per replicate and placed them into a new Petri plate with a control agar medium. We then estimated more precisely population size by counting individuals that were left on the Petri plates from the given generation after placing them at 4°C for one hour to slow down the movement of individuals.

After cleaning the individuals off the plate, there were still hundreds of eggs adhered to the surface of the plate. We used these eggs for our phenotypic measures. Approximately 100 eggs were taken from the original Petri plate and transferred into a 6 cm diameter

Petri plate, contained 10 ml of NGM (same medium than during the three previous generations) and 250  $\mu$ l of 5:1 UV-killed OP50 ( $OD_{600nm}$  of 3), to measure survival and sex-ratio after 48h. We scored as dead eggs that did not hatch and worms that did not move their body or their head in response to three repeated stimulations with a platinum transfer pick (Sutphin & Kaeberlein, 2009). Visual differentiation between males and hermaphrodites starts to be possible at L4 larval stage (Sulston *et al.*, 1980). As the individuals that survived were at least at the L4 stage, we could determine their sex based on morphological criteria. Because of the developmental delay happening in the salt treatment, sex ratio in this treatment was only evaluated at 72h.

We measured phenotypic traits on both hermaphrodites and males. To measure brood size, and index of fertility, three hermaphrodites per replicate were transferred individually in a well of a tissue culture plate (12-well, same medium than in the original Petri plate) containing 2 ml of NGM per well and 75  $\mu$ l of 5:1 UV-killed OP50. Brood size was measured as the number of hatched progeny produced by a hermaphrodite. An index of early and late (hatched progeny produced before and after 96h of age) fertility was also used.

We measured morphological traits using pictures of individuals taken with a stereomicroscope (Olympus SZX12, 1.6 x 90 magnification) and a computer-connected camera (Nikon D5000). As for fertility, males and hermaphrodites were measured at 96h. Image analyses for males' body length were done by a rapid and automatic procedure, used in batch, developed in Matlab (R2010b, Mathworks ©). First a background subtraction is applied and the body is extracted by a classic thresholding method. A skeletonization algorithm is then used to obtain the relevant body points, which serve as basis for a spline of interpolation to measure the precise length of each

individual (see appendix D for more details on the automatic procedure). We could not measure hermaphrodites with this method because of the presence of bacteria, altering the differentiation of individuals. Consequently, we used ImageJ software (Rasband, 2012) and measured their body length manually. We validated the automatic measures by comparing them with a sample of manual measures in males; and found a very strong correlation between the two methods ( $r = 0.97$ ,  $n = 15$ ). Body length was used as an index of growth between 0 to 96h of age.

We finally measured male body bend frequency at 96 h, as an index of locomotion behaviour. One body bend equals a change in the direction of the anterior part of the worm (including the posterior bulb of the pharynx) along the Y axis using the body of the worm as the X axis (Tsalik & Hobert, 2003). Individuals on a 6 cm Petri plate were washed twice with washing buffer that permitted a rapid sedimentation of individuals in the liquid. The buffer was composed of 5 mM HEPES, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5  $\text{g.l}^{-1}$  gelatin (Saeki *et al.*, 2001). Then, individuals were placed onto a 6 cm diameter Petri plate containing 10 ml of NGM but no bacteria. After five minutes, we counted the number of body bends over 20 s of three males per replicate. We focused on male body bend: in addition to providing movements necessary for finding the good living conditions in both males and hermaphrodites, locomotion behaviour is also necessary for males to encounter and fertilize hermaphrodites (Pannell, 2002 ; Barrière & Félix, 2005a).

#### 2.4. Effects of pollutants on traits

Changes occurring during the first four generations included both plastic (e.g. individual phenotypic plasticity, maternal, and grand-maternal effects) and evolutionary responses to selection, whereas after generation 4 between-generation phenotypic changes caused



by plastic effects were negligible (Scheiner, 1993 ; Mousseau & Fox, 1998 ; Gagliano & McCormick, 2007 ; Räsänen & Kruuk, 2007), leaving essentially evolutionary changes to be responsible for the observed changes across generations. We thus ran models where we estimated evolutionary (i.e. genetic) changes as the changes occurring between generation 4 and 22. Although in this study, we focused on evolutionary changes, we presented analyses for the first four generations in appendix E.

We used a Bayesian model approach in the MCMCglmm package for generalized linear mixed-effects model (Hadfield, 2010) in the R software (R Development Core Team, 2012). We fitted multivariate generalized linear mixed-effects models on hermaphrodite (i.e. quadrivariate models on total, early, and late fertility, and growth) and male traits (i.e. bivariate models on body bend and growth). We also used univariate models to analyse the changes in mean survival, sex ratio (see appendix F for more details on these traits), and population size. For each model we successively added environment, generation (as a continuous variable), and their interactions as fixed effects. For the mixed models, we included replicate populations as a random effect. This allowed us to estimate the (co)variance between replicates and within replicates [or residual (co)variance], and to control for the dependence of data within each replicate across generations. For each selected model we estimated the replicate effects as the sum of (co)variance between replicates divided by the sum of (co)variance within and between replicates. We provide more details on variance between replicates in appendix G. We modelled all the traits with a normal error structure. The multivariate analysis allowed us to estimate a full matrix of posterior distributions of (co)variance for all the traits in the model, and to take into account the fact that associated traits may not evolve independently of each other.

Prior to analyse, we rescaled the traits by subtracting each value by the mean of the sample and dividing it by twice the standard deviation (Gelman, 2008). After having tested different priors (see for example Teplitsky *et al.*, 2011), we retained a proper prior ( $nu = k - 1 + 0.002$ ) with a very low variance parameter ( $V = \text{diag}(k) * V_p * 0.05$ ), where  $V_p$  is the phenotypic variance,  $k$  the dimension of  $V$  (i.e. number of traits). We allowed models to estimate different random and residual variances, and covariances between pairs of traits. After having checked for the convergence of parameters values (i.e. number of iterations, burn-in phase and thinning) and the absence of autocorrelation, we retained 110 000 iterations with a burn-in phase of 10 000, for a total of 1 000 samples for each analysis.

For each trait we previously fitted univariate models with temporal autocorrelation in nlme package (Pinheiro & Bates, 2000). We wanted to check if the significant differences were the same than in our multivariate models without correction for temporal dependency. Although the  $p$ -values (nlme) were slightly different from  $p$ -MCMC (MCMCglmm), the significant effects (i.e.  $p\text{-MCMC} \approx p\text{-value} < 0.05$ ) were the same in both models (data not shown).  $p$ -MCMC is the proportion of cases where the samples from the MCMC chains is less than the significance level (here 0.05), equivalent to  $p$ -values (Hadfield, 2010 ; Teplitsky *et al.*, 2011).

We used the posterior distribution of each trait analysed to estimate the parameter value and its confidence intervals (CI). We considered significant differences for a trait between two environments or two different generations, when the 95% interval of highest posterior density (HPDI) for the subtraction between the whole posterior distributions of both estimates did not overlap 0. We used “significant” even if with a Bayesian approach significance reflects more a difference that is considered as non negligible (differ from the



significance level commonly used in a frequentist approach). For the study of the evolutionary responses to selection, we used the posterior mode of the distribution of both the intercept (i.e. an estimate of the relative level of the trait for each treatment for a fixed generation) and of the slope of the linear regression of each treatment as a function of generations (i.e. an estimate of the relative change between generations in the value of the trait in one treatment relative to the control). Slopes were considered significant when their 95% HPDI did not overlap 0. We compared deviance information criterion (DIC) of models including different effects. We retained, as best fitted model, the model with the lowest DIC and this DIC differed from the second best fitted model's DIC by more than 5 (Spiegelhalter *et al.*, 2007). When two models had DICs within a range of 5, we retained the most parsimonious one (i.e. with the lowest number of parameters).

## 2.5. Effects on the phenotypic/genetic structure of traits

We assessed divergence of phenotypic pattern of traits (co)variance through time and between populations. As we mentioned earlier, we assumed that phenotypic changes occurring between generation 4 and 22 were primarily of genetic origin. Consequently, we interpret these phenotypic changes as changes in the **G** matrix over time. However, we also show the changes observed during generations 1 and 4 as changes in the **P** matrix (without being able to separate genetic from environmental effects).

For these analyses we created matrices for the three constant environments (i.e. control, uranium, and salt) and for traits in hermaphrodites (i.e. total, early, and late fertility, and growth), and in males (i.e. body bend and growth). To increase the robustness of analyses, we assessed the temporal changes in each treatment by pooling data over successive generations (i.e. data from generation 1 to 4, 4 to 10, and 13 to 22). We used

these pooled sample to analyse the **P** matrix (**G**<sub>1</sub>: generation 1 to 4), and both the early (**G**<sub>2</sub>: generation 4 to 10) and late (**G**<sub>3</sub>: generation 13 to 22) potential evolutionary changes. For each treatment we ran pairwise comparisons between each successive matrix (**G**<sub>1</sub> vs. **G**<sub>2</sub>, **G**<sub>2</sub> vs. **G**<sub>3</sub>). We then compared two matrices (i.e. **G**<sub>1</sub>: generation 1 to 4 and **G**<sub>4</sub>: generation 4 to 22) to analyse the differences between treatments at each time. Results using **G**<sub>2</sub> and **G**<sub>3</sub> or only **G**<sub>4</sub> provided equivalent posterior modes, but larger HPDIs. Below we thus restrict the presentation of the comparisons of **G**<sub>1</sub> and **G**<sub>4</sub> only.

We combined Bayesian linear-mixed effect models with a bootstrap (resampling with replacement) procedure to calculate the angle between the first principal components (eigenvectors) of both matrices. Some developments in matrix comparisons have enabled one to compare all the dimensions of **G** matrices (Phillips & Arnold, 1999 ; Roff, 2002a). However, some authors (Berner *et al.*, 2010 ; Johansson *et al.*, 2012) have suggested that differences in the first eigenvector of the matrices may explain most of the variation in the matrix structure, and thus that the method comparing the first eigenvector of these matrices is sufficient to estimate changes of the structure of the matrix. This methods is also the one used to measure of the genetic line of least resistance (Schluter, 1996). For the comparison of the eigenvector of the matrices we ran models not including any fixed effect. However, we included replicate populations as a random effect. After several tests, we decided to keep the same priors and parameters values as in the models on the evolutionary responses. Then after a principal component analysis of the obtained matrices, we measured the cosine of the angle  $\theta$ , between the first eigenvectors of both matrices by cosine similarity:

$$\cos(\theta) = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{\|\lambda_1\| \|\lambda_2\|},$$

where  $\lambda_i$  and  $\|\lambda_i\|$  are respectively the first eigenvector and the norm of the first eigenvector of the matrix  $i$ . We also estimated differences in matrix eccentricity, which is the ratio of the first eigenvalue to the sum of the remaining eigenvalues and in overall matrix size, which is the sum of the eigenvalues. A low matrix eccentricity indicates some instability in the orientation of the primary eigenvector of the matrix and reduction of matrix size suggests a reduction of variance and covariance (Jones *et al.*, 2003). To confirm the estimations of angle, eccentricity or size, we ran a bootstrap procedure with 1 000 iterations for each comparison and calculated posterior mode of distribution and 95% CI. Moreover, to consider a significant difference between two angles (or another parameter) the 95% CI of subtraction between the distributions of the two angles should not overlap 0. In the bootstrap procedure, we corrected automatically the arbitrary change in the sign of the eigenvectors of any particular axis (axis reflection) and the reordering of axis due to very similar eigenvalues. However, it is easy to check these problems and so rearrange the matrices automatically.

### 3. Results

#### 3.1. Evolutionary responses

The best fitted model for the temporal changes in hermaphrodite traits included an interaction between treatment and generation and a covariance between traits (Table 6). We found the same result when we limited the analysis to each combination of two traits, except between growth and late fertility (see appendix H for more details on bivariate models). For males the selected model included the interaction between treatment and generation, but including trait covariance did not improve the fit of the model. This indicates that, for both sexes, trait changes across generations differed according to the

treatment. The replicate effects explained less than 4% of the (co)variance among traits in these models.

Although we show the comparisons between the intercepts (value at generation 4) in the different environments (Table 7), we will focus below on the comparisons between the slopes of each environment. Slopes provide information on the differential rate of evolution of populations in these environments. Traits did not change across generations in the control treatment, except for a slight reduction in late fertility, which did not affect total fertility (Table 7 and Figure 16A). Evolutionary responses between generation 4 and 22 were generally higher in salt (1-5% per generation) than in uranium (1-2% per generation). The strongest evolutionary response for fertility happened in the alternating treatment. The evolutionary response was significant for early fertility in uranium, for late fertility in salt, and for both of these traits in the alternating treatment (Table 7 and Figure 16C, D). Traits related to reproduction produced stronger positive evolutionary response (2-5% per generation) than traits related to growth (1-2% per generation; Table 7, Figure 16B, F and see appendix J Figure J1). Male body bend was affected in the salt and in the alternating treatments, and increased between generation 4 and 22, but did not change significantly in the uranium treatment (Table 7 and Figure 16E).

We started each replicate population with 500 individuals. After three days and at each generation, population size in the control environment reached 20 000 individuals on average (Table 8, Figure 17, and see appendix J Figure J2). In the uranium treatment, population size increased from 10 000 at generation 1 to more than 15 000 at generation 22. Population size varied around 3000 individuals in the salt treatment during the whole experience. In the alternating treatment, population size varied between 3000 and 10000 individuals, without showing any particular temporal trend.

Table 6. Effect of generation and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) on hermaphrodite (growth, total fertility, early, and late fertility) and male (growth and body bend) traits, measured between generation 4 and 22 of the multigenerational experiment.

We used multivariate mixed models with all the traits included as dependent variables, and compared different models using deviance information criterion (DIC). We also ran models only for hermaphrodite growth and total fertility. Left-hand side: characteristics of the fixed effects included in each model (the first DIC value corresponds to a simple model including only replicate as a random effect). Right-hand side: DIC of the model followed by the change ( $\Delta$ ) in DIC value between this model and the previous model that did not include the fixed effect. Except for the models shown at the last line for each sex, covariance between traits was allowed in the priors. In bold: selected models for which  $\Delta$ DIC  $> 5$ , i.e. the model including interaction had a smaller DIC. Replicate effect in these models represents 3.3%, 2.3% and 2.8% of the total variance for hermaphrodite traits – quadrivariate and bivariate models – and for male traits, respectively.

| Effects included within the model             | DIC              | $\Delta$ DIC   |
|---|------------------|----------------|
| for hermaphrodite traits                      |                  |                |
| -   | -2506.140        | -              |
| environment                                   | -2538.996        | -32.856        |
| environment + generation                      | -2588.716        | -49.720        |
| environment x generation                      | <b>-2653.526</b> | <b>-64.810</b> |
| environment x generation (no covariance)      | 445.699          | 3098.535       |
| for male traits                               |                  |                |
| -   | 701.020          | -              |
| environment                                   | 683.189          | -17.831        |
| environment + generation                      | 631.832          | -51.357        |
| environment x generation                      | 605.585          | -26.247        |
| environment x generation (without covariance) | <b>608.146</b>   | <b>2.561</b>   |







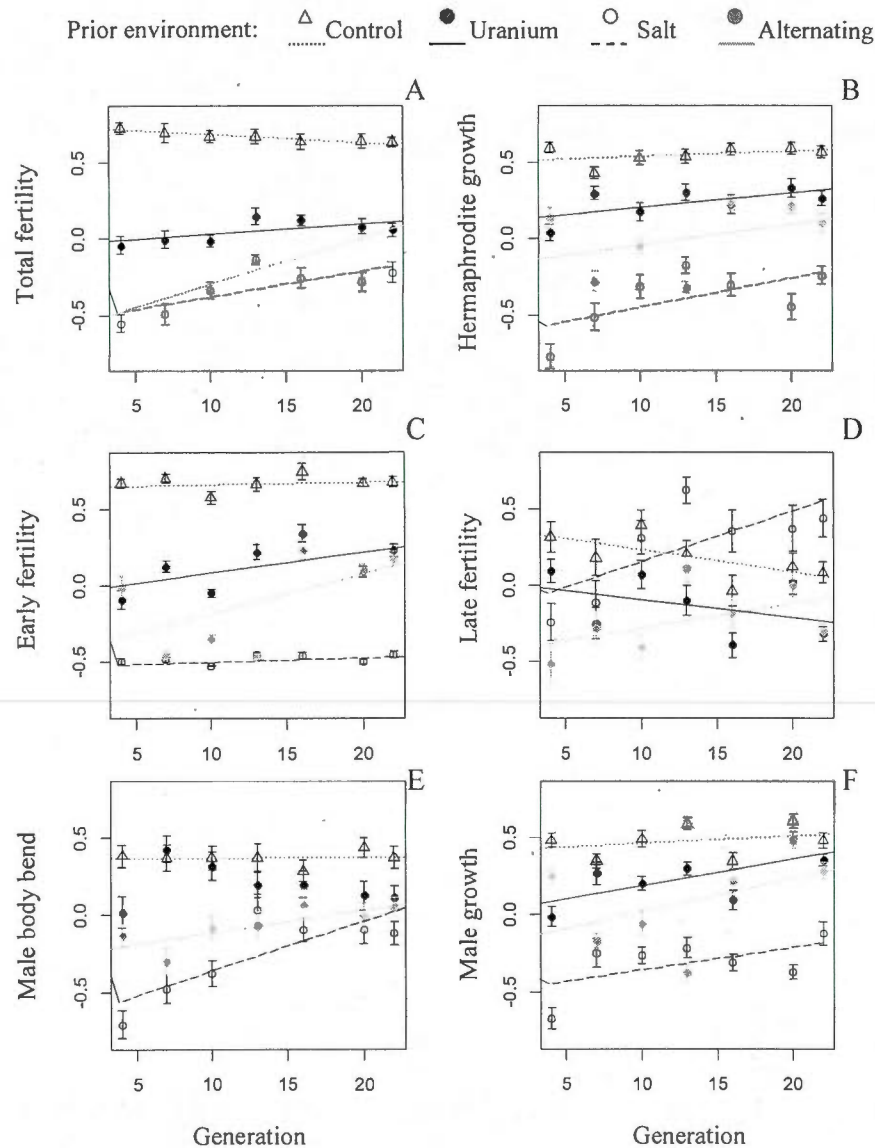


Figure 16. Evolutionary responses of hermaphrodite total fertility (A), growth (B), early (C) and late (D) fertility, and male growth (E) and body bend (F), between generation 4 and 22.

Each symbol corresponds to the mean value of the trait and its standard error ( $n = 18$  individuals/treatment/generation). Traits values were rescaled prior to analysis by subtracting each value by the mean of the sample and dividing it by twice the standard deviation. Control (empty triangle), uranium (filled black dots), salt (empty dots), and alternating uranium and salt (filled grey dots) environments. Regression lines correspond to posterior mode of the distribution for intercept and slope (generation was a continuous fixed effects). Small dashed line: control; black line: uranium; large dashed line: salt; grey line: alternating uranium and salt environments.



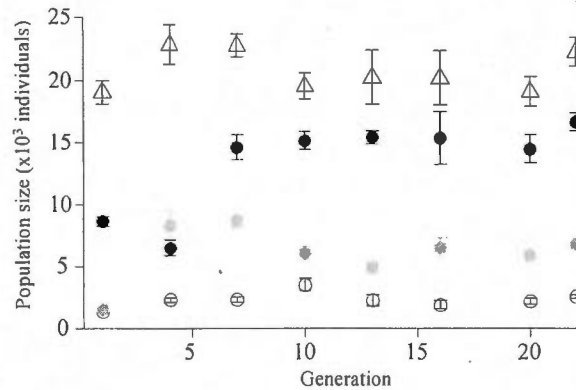


Figure 17. Changes in average population size between generation 1 and 22. Symbols show the mean value and standard error over 6 replicated populations in control (empty triangle), uranium (filled black dots), salt (empty dots), and alternating uranium and salt (filled grey dots) treatments.

### 3.2. Comparison of (co)variance matrices

We did not find any covariance between growth and body bend of males. Furthermore, tests for traits in males revealed angles of 0 degrees in all environments (data not shown). Below we thus only present matrix comparison for traits of hermaphrodites.

In the uranium treatment we found a strong divergence in phenotypic (co)variance structure between the matrices  $G_1$  and  $G_2$  ( $>43$  degrees and CI for  $\theta$  were not close to 0, Figure 18 and see appendix K for graphical representation). We found an equivalent divergence between  $G_1$  in uranium and  $G_1$  in control (Figure 19). However, we did not observe any divergence between  $G_2$  and  $G_3$  (Figure 18), or between  $G_4$  in uranium and  $G_4$  in control (Figure 19). In contrast, we found a moderate divergence ( $>20$  degrees and CI for  $\theta$  were not close to 0) between salt and control populations in both  $G_1$  and  $G_4$  as well as between salt and uranium populations for the same period (Figure 19). The first

eigenvector for the matrices  $G_1$  and  $G_4$  accounted for 68% to 80 % of the total variance in all environments, except for  $G_4$  in uranium (57%).

Matrix size for  $G_4$  in salt was significantly higher than for  $G_4$  in control and uranium (

Table 9 and 95% HPDI of the subtraction did not overlap 0). Matrix eccentricity for  $G_4$  in control was significantly lower than in salt but higher than in uranium (Table 9 and 95% HPDI of the subtraction did not overlap 0).

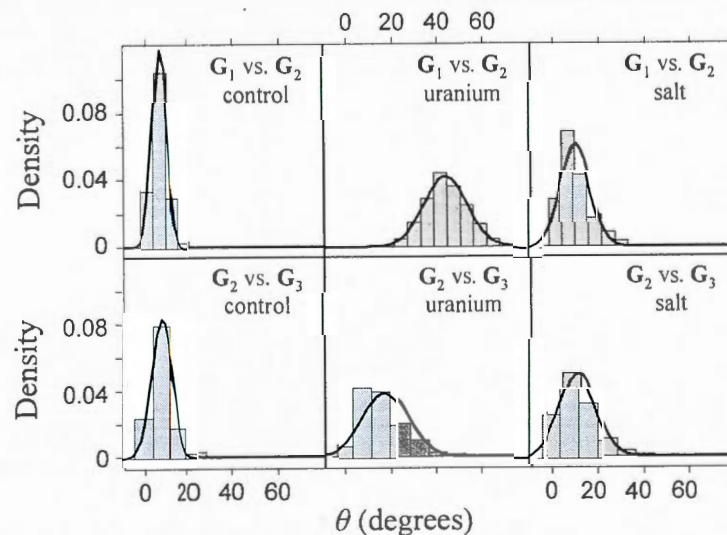


Figure 18. Distribution of density of the angle ( $\theta$ ) between different periods.

$\theta$  obtained by a resampling procedure, between the first principal components (eigenvectors) of both matrices of (co)variance for hermaphrodite traits (total fertility, early and late fertility, and growth) between two periods  $G_1$  (generation 1 to 4) vs.  $G_2$  (generation 4 to 10); and  $G_2$  vs.  $G_3$  (generation 13 to 22). We used this procedure for the populations from control, uranium, and salt environments. Error bars denote 95% confidence intervals for  $\theta$  obtained using a resampling procedure.

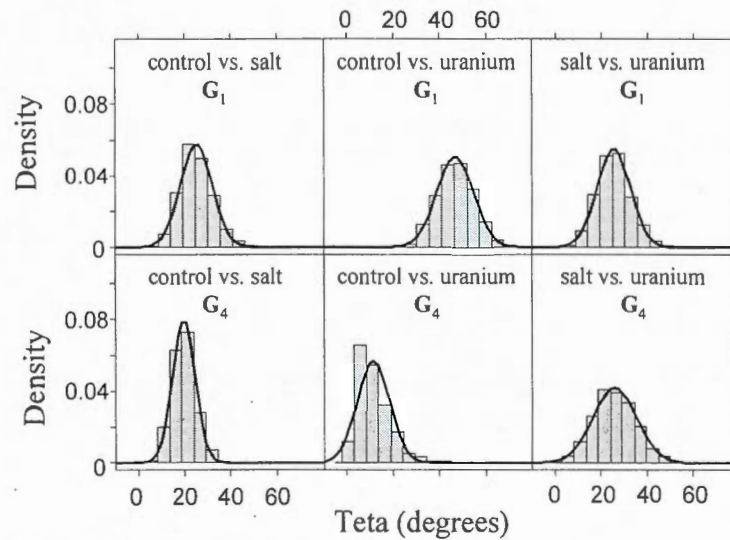


Figure 19. Distribution of density of the angle ( $\theta$ ) between different environments.

$\theta$  obtained by a resampling procedure, between the first principal components (eigenvectors) of both matrices of (co)variance for hermaphrodite traits (total fertility, early and late fertility, and growth) between populations from two environments: control vs. salt, control vs. uranium, and salt vs. uranium. We used this procedure for the periods G1 (generation 1 to 4) and G4 (generation 4 to 22). Error bars denote 95% confidence intervals for  $\theta$  obtained using a resampling procedure.

Table 9. Measures of matrix eccentricity and size and their 95% highest and lowest of confidence intervals (CI), obtained by a resampling procedure, of matrices of (co)variance for hermaphrodite traits (total fertility, early and late fertility, and growth) in the control, the uranium and the salt environments. We created matrices for the periods G1 (generation 1 to 4), G2 (generation 4 to 10), G3 (generation 13 to 22), and G4 (generation 4 to 22).

| Environment | Period         | Matrix eccentricity |                |                | Matrix size    |                |                |
|-------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|             |                | Posterior mode      | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Control     | G <sub>1</sub> | 3.32                | 1.83           | 5.26           | 0.35           | 0.23           | 0.47           |
|             | G <sub>2</sub> | 2.91                | 1.86           | 4.50           | 0.26           | 0.19           | 0.33           |
|             | G <sub>3</sub> | 1.98                | 1.15           | 3.22           | 0.22           | 0.16           | 0.29           |
|             | G <sub>4</sub> | 2.29                | 1.58           | 3.17           | 0.25           | 0.20           | 0.31           |
| Salt        | G <sub>1</sub> | 2.44                | 1.59           | 3.79           | 0.38           | 0.31           | 0.46           |
|             | G <sub>2</sub> | 2.43                | 1.44           | 4.15           | 0.50           | 0.38           | 0.62           |
|             | G <sub>3</sub> | 2.88                | 1.73           | 4.85           | 0.40           | 0.31           | 0.51           |
|             | G <sub>4</sub> | 3.09                | 2.08           | 4.57           | 0.47           | 0.38           | 0.56           |
| Uranium     | G <sub>1</sub> | 2.20                | 1.48           | 3.36           | 0.49           | 0.39           | 0.59           |
|             | G <sub>2</sub> | 1.60                | 0.95           | 2.68           | 0.30           | 0.22           | 0.39           |
|             | G <sub>3</sub> | 1.12                | 0.73           | 1.64           | 0.24           | 0.19           | 0.30           |
|             | G <sub>4</sub> | 1.35                | 0.95           | 1.89           | 0.28           | 0.24           | 0.34           |



#### 4. Discussion

This laboratory study demonstrated that *C. elegans* populations can increase their resistance to pollutants in only a few generations, and that these changes are very likely evolutionary and adaptive, or correspond to cross-generation genetic changes resulting from novel selection pressures. The intensity of selection pressures in the salt treatment led to a stronger evolutionary response in this medium than in uranium. The evolutionary response of fertility was higher in the alternating than in the other environments. However, unlike for uranium populations, population size in this treatment did not increase significantly across generations. We finally detected changes in the (co)variance structure in uranium and in salt populations compare to control populations, or through time. These results suggest that changes in the genetic structure can depend on the environment in which the populations live, and that selection pressures in a novel environment can quickly alter the genetic structure of a population.

##### 4.1. Microevolution to constant pollution

The presence of microevolutionary change in the different polluted environments go in the same direction as results found by Lopes *et al.* (2008) on the capacity of a genetically diverse population of *C. elegans* to respond to selection by a pesticide. We found previously that traits were heritable in this *C. elegans* population (article II) and now that novel selection pressures were entailed by the pollutants. We thus have all the necessary conditions for populations to quickly adapt to novel stressor in the environment (Xie & Klerks, 2003 ; Ward & Robinson, 2005 ; Salice *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b).

Although we cannot rule them out completely, epigenetic effects are highly unlikely to have generated cross-generation changes during the whole study period. They may have



strong effects during the first four generations though (e.g. Anway *et al.*, 2005 ; Molinier *et al.*, 2006). We also consider that genetic drift was extremely low since we had low replicate effects in our models (Table 6 and see appendix G for more details on variance between replicates) and we did not see change through time in the control populations. Therefore, the successive phenotypic measures through time allowed us to evaluate the speed of the evolutionary response due to the selection in salt and uranium treatments (Posthuma & Van Straalen, 1993 ; Medina *et al.*, 2007).

Populations responded to both pollutants by increasing their fertility. However we found a stronger evolutionary response in salt than in uranium, with a 3.5% increase per generation for total fertility in the former (and 4.8% for late fertility). In addition, generation time was longer in the salt than in the uranium or the control treatment (i.e. around four days instead of three; unpublished data and Table 7). Consequently, salt populations were studied for about 17 generations in this environment compared to the other populations, and evolutionary responses were probably underestimated in this environment.

Why would evolutionary response faster in salt than in uranium? We chose the concentration that reduced the fertility of almost 60 % at the first generation for both pollutants. However, despite that precaution, selection pressures could be stronger in salt as suggested by the stronger reduction in survival in this medium (see appendix F for survival analyses). Indeed some genotypes could be removed faster from the salt population. Then the heritability in uranium was lower than in the other treatments (see article II) and this could also constraint the evolutionary potential of traits in that medium (see e.g. Wilson *et al.*, 2006). In uranium, heritability was not even significantly higher than 0 in article II. It could be explained by a lack of power to detect a very low heritability

with the method used in this other study since in our current paper we showed a significant evolutionary response in uranium. Our result also show that population reacted quickly to uranium by showing relatively strong acclimation during the first four generations of exposition (see appendix E for analyses of first generations). That quick acclimation may have also reduced the strength of selection on the traits and thus the evolutionary rate in the uranium populations (West-Eberhard, 2003). Moreover, uranium strongly affected the traits at the first generation but its effects were reduced by the third generation. Acclimation in these populations may have thus been related to maternal effects (i.e. response through cross-generation phenotypic plasticity) rather than to within-individual phenotypic plasticity (Mousseau & Fox, 1998). A population's response to a novel environment by acclimation or by adaptive processes can have completely different implications on the future of the population. Although plasticity is also a costly strategy (DeWitt *et al.*, 1998), it does not entail any long-term costs of adaptation, such as a reduction of genetic diversity (Ward & Robinson, 2005 ; Athrey *et al.*, 2007). Consequently, populations that respond to a novel environment by plasticity can cope with a larger range of conditions.

Growth for both sexes in all polluted environments has improved over time compared to control, except for hermaphrodites in uranium. However, in some case, we were not able to clearly conclude that the evolutionary response was significant (i.e. the HPDI slightly overlapped 0). It should be noted that, given the trends observed in our study, the evolutionary response could have become significant if we had run the experiment for a few more generations. Another explanation could be that fitness is more strongly related to fertility than to growth (Maynard Smith, 1989), and thus growth may be subject to weaker selection pressures and not evolve as quickly as fertility.

The locomotory response to uranium treatment was likely plastic since body bend frequency was not significantly affected anymore after generation 4. In contrast there was a positive evolutionary response of salt and alternating populations after a reduction in the first generations (see appendix E for analyses of first generations). Pollutants commonly decrease the frequency of body bends in *C. elegans* (e.g. Wang & Xing, 2008). Since, locomotion behaviour promotes encounter rate between males and hermaphrodites (Pannell, 2002 ; Barrière & Félix, 2005a ; Lopes *et al.*, 2008), outcrossing could be affected in polluted environments. It should be noted that compared to self-fertilization outcrossing permits hermaphrodites double or quadruple their fertility (Hodgkin, 1988 ; LaMunyon & Ward, 1998). However, the ratio of males, also an index of conservation of outcrossing rate (Ward & Carrel, 1979 ; Prahlad *et al.*, 2003 ; Teotónio *et al.*, 2006), was just slightly affected in the uranium and the alternating environments, and not at all in salt (see appendix F for sex ratio analyses). The effects on locomotion, associated to reduction of survival, for salt populations can explain in part the difficulties for population to grow as fast in the uranium and in control treatments.

#### 4.2. Microevolution in response to alternating pollution

Although selection in a heterogeneous environment is assumed to maintain greater levels of genetic variation for fitness (Gram & Sork, 2001 ; Roff, 2002b), we highlighted a stronger evolutionary response for fertility in the alternating treatment. Previous studies have found cases of adaptation to heterogeneous environmental conditions by evolution of a more generalist way of life (Reboud & Bell, 1997 ; Cooper & Lenski, 2000 ; Turner & Elena, 2000). In those cases, the process involved in the evolution of generalism seems to be mutation accumulation (Kawecki, 1994) and not a positive trade-off between the environments. In our study we worked with only 22 generations, and the mutation rate

was likely insufficient to be at the origin of the evolutionary changes observed (Mackay *et al.*, 1994 ; Denver *et al.*, 2009). Moreover, it is likely that some temporal fluctuating regimes entailed opposed selection pressures (e.g. alternated light and dark in *Chlamydomonas* algae; Reboud & Bell, 1997). In contrast, we showed here a positive response on early fertility in uranium and late fertility in salt. We assume that the rapid evolutionary changes observed in the alternating treatment were caused by the same tendencies of directional selection on total fertility for both uranium and salt. Our study may provide the first evidence that the evolution of generalism can happen because of a positive trade-off on life history traits between the environments.

With our alternating treatment we could also have selected individuals having the capacity to face both pollutants. Adaptive plasticity can evolve in environments where phenotypic plasticity is beneficial and its maintenance costs are low (DeWitt *et al.*, 1998). Plasticity may be particularly beneficial and an evolutionary alternative to local adaptation (Kawecki & Ebert, 2004) when populations grow in a spatially heterogeneous environment or when temporal variability is important relative to the life cycle of the organisms (Pigliucci, 1996 ; Ghalambor *et al.*, 2007). For example, a contamination may not be spatially homogeneous in a polluted habitat. The intensity of stress may also be temporally variable and may promote plastic genotypes rather than only resistant, adapted, genotypes (Morgan *et al.*, 2007). Previous theoretical studies came to the same conclusions (e.g. Gomulkiewicz & Kirkpatrick, 1992), but stating that it was necessary that the variability is predictable (Kaplan & Cooper, 1984), as in our alternating treatment. In order to verifying this assumption, constant and alternating populations should be placed in the two constant environments to compare their fitness in both environments.



However, even if survival and fertility increased in alternating treatments across generations the population size did not enhanced throughout the experiment. During adaptation to a stressful environment, effects of genetic variation in population can be restricted to some traits (Agashe *et al.*, 2011). In alternating treatment the genetic variance enhances fitness strongly if the period of oscillation is long (and not sudden as in our study) and the amplitude is large (and not a change at each generation). Otherwise there may be an effect of genetic load (i.e. cost of lost alleles due to selection or mutation) caused by the recurrent change of phenotypic optima (see Lande & Shannon, 1996). Consequently, even if population seems to face this alternating polluted environment, the negative implications on population were severe.

#### 4.3. Strength of structure between traits

Uranium populations only showed divergence in their phenotypic structure (i.e. the first four generations) compared to control populations and also between the first four generation and the period of early potential evolutionary changes. Nonetheless, comparisons of  $G_4$  (i.e. after three generations of exposition) revealed a reduction in matrix size or eccentricity in uranium populations compared to control or salt populations. We thus assume the matrix change in uranium mostly due to environmental effects despite shrinkage of its genetic (co)variance components combined with a reduction of stability in the orientation of its primary eigenvector.

In contrast, the moderate divergence between salt and the other populations was present from the first generations of exposition and stayed equivalent in the subsequent generations. Thus matrix change in salt did not permit us to discriminate potential genetic effects from environmental effects. However, increase of matrix size and higher

eccentricity occurred after three generations of exposition. Consequently genetic variance and covariance have probably increased and reinforced the stability of correlation between traits. This implies a stronger association between the traits that may constrain their independent evolution.

Studies on the stability of **G** matrix, in particular on the first eigenvector orientation, already revealed divergence after hundreds or thousands of generations of evolution for natural populations (e.g. Cano *et al.*, 2004 ; Doroszuk *et al.*, 2008 ; Berner *et al.*, 2010 ; Johansson *et al.*, 2012). Moreover, **G** matrix can suffer considerable changes over a few generations. For example, Sgrò & Blows (2004) have shown some alteration of the genetic structure in *Drosophila* populations, for populations that had evolved for 30 generations in different heat stress environments. Cross-environment genetic correlations declined as environments became more different, even upon arrival in different stressful environment, the genetic correlation can change of sign (reviewed by Sgrò & Hoffmann, 2004).

Interestingly, the effects of uranium and salt on the structure of traits were opposed. Previously, in isogenic line of the same population of *C. elegans*, we found higher heritability and a positive genetic correlation for fertility and growth in salt than in uranium (article II). This information added to the apparent reduction of stability of structure through generations would suggest that the covariance between growth and fertility traits diminished in uranium. All these differences between environments were probably in part at the origin of the differential evolutionary responses between uranium and salt populations. Moreover, there was a stronger evolutionary response for fertility in both stressful environments than for the other traits. Thus the positive correlation between hermaphrodite growth and fertility in salt could explain the positive



evolutionary response existing for growth in salt and absent in uranium. This method based on phenotypic measures permitted us to highlight alterations of phenotypic structure in polluted environment. These alterations were due to environmental changes but apparently also to genetic changes across generations of exposition, implying induction of changes of life history strategies for populations.

## 5. Conclusion

We have shown that rapid adaptation to different polluted environments may involve differential and complex evolutionary responses of life history traits. This is due to the action of the strength of selection pressures, capacity to response by acclimation and (co)variance structure between traits. Moreover, in alternating environment the populations had the strongest evolutionary response for fertility. Thus, the selection of a generalist type did not entail a reduction of resistance for both pollutants. Effects of pollutants can be extremely fast on life history traits of populations in few generations. Studies on microevolutionary processes due to pollutants should now focus also on the *G* matrix stability to confirm the feature of rapid divergence of structure between traits and depending on pollutant. This will help to highlight the consequences of pollution on the evolutionary potential of traits.

## Acknowledgments

We especially thank H. Teotónio for providing us with his base population. We are grateful to P. Peres-Neto, L. Garcia-Sanchez, P.K. Ingvarsson for statistical advice. We also thank R. Beaudouin, M. Gauduchon, R. Gilbin, P. Peres-Neto, G. Stora, and J.

Verreault for discussion in the early stage of this project. This work was part of the Envirhom-Eco research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.



#### ARTICLE IV

### BENEFITS AND COSTS OF ADAPTATION TO CONSTANT AND ALTERNATING POLLUTED ENVIRONMENTS

Morgan Dutilleul, Denis Réale, Benoit Goussen, Catherine Lecomte, Simon Galas, Jean-Marc Bonzom. Evolutionary Applications. In prep

#### Abstract

Some populations are able to adapt to anthropogenic stressors such as pollutants, when the selection pressures entailed are not too high. However, this evolution may be accompanied with some costs related to adaptation in the novel environment. Evaluating these costs is important for our understanding of the evolution of local adaptation and specialization to certain environments. Here, we used an experimental evolution approach, *C. elegans* were exposed to uranium (U), salt (NaCl) and alternating U and NaCl treatment during 22 generations. In parallel, at generation 6, 9, 12, 15, 18 and 23, we ran experiments to compare fertility, growth, and locomotion of the populations, having evolved in the different environments: in the environment of origin (i.e. common garden) at the control temperature or at an increase of 5°C, and in the other environments of their environment of evolution (i.e. reciprocal transplant). Our results showed rapid evolutionary changes and different life history strategy for selected individuals depending on the pollution regimes but none of these populations reached the fitness of the controlled populations. Populations that had evolved in each of the three stressful environments showed a lower fitness than control, when they lived at both original and the increased temperature. Furthermore, populations specialize to salt were more susceptible to uranium but the reverse was not true. Finally, populations adapted to the alternating environment possessed individuals with the best cumulative fitness for both of these pollutants. Assessing costs of rapid adaptation may be crucial regarding the Ecological Risk Assessment. It permits to evaluate the impact of evolutionary response to pollutants on the susceptibility changes of populations to environmental conditions.

Keywords: experimental evolution; costs of adaptation; life history strategy; resistance; local adaptation; evolution of generalism; *Caenorhabditis elegans*; pollution; uranium

## 1. Introduction

Environmental changes are assumed to have increased in frequency and intensity throughout the world, as a result of anthropogenic activities (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). These sudden and important changes may be extremely critical for the future of natural populations (Tilman & Lehman, 2001 ; Bell & Collins, 2008). Genetic variation is supposed to allow populations to adapt quickly to severe and novel stressors, and thus to limit their risks of extinction (Hoffmann & Parsons, 1991 ; Charlesworth & Hughes, 2000 ; Reed *et al.*, 2003 ; Bell & Collins, 2008). Experimental and field studies have shown microevolution for populations in response of different pollutants such as xenobiotics or heavy metals (Xie & Klerks, 2003 ; Ward & Robinson, 2005 ; Morgan *et al.*, 2007 ; Lopes *et al.*, 2008 ; Brausch & Smith, 2009 ; Salice *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b). Here we consider as pollutants substances that exceed a threshold concentration causing adverse effects on all or part of the ecosystem (AFNOR, 1994).

Rapid adaptation goes through the selection of individuals with characteristics providing a better fitness in the given environment, and a disappearance of less fitted genotypes in the short time frame of a few generations (Hoffmann & Parsons, 1991 ; Posthuma & Van Straalen, 1993 ; Morgan *et al.*, 2007). This adaptive response is assumed to come with a cost: the genetic impoverishment leads to a reduction of the evolutionary potential of the population, which may restrict it from dealing with novel selection pressures associated with subsequent stressors (Bergelson & Purrington, 1996 ; Coustau *et al.*, 2000 ; Xie & Klerks, 2003 ; Salice *et al.*, 2010). Understanding under which conditions adaptation to an environment is costly is a critical issue in evolutionary and in conservation biology. Firstly, rapid adaptation can be associated with a reduction of genetic diversity (Ward & Robinson, 2005 ; Athrey *et al.*, 2007) generally correlated to a decrease in individuals'



fitness (Reed & Frankham, 2003). Secondly, associated to the reduction of genetic diversity, costs of adaptation can be due to selection of individuals with specific strategies conferring a selective advantage in the novel environment. The selection can be done indirectly on the life history traits. For example; the selection of genotypes allocating more resources to detoxification mechanisms at the expense of other fitness related functions (e.g. growth or reproduction). In the absence of the pollutant these highly detoxifying genotypes may show a reduced fitness compared to the lowly detoxifying genotypes (Kraaijeveld & Godfrey, 1997 ; Burdon & Thrall, 2003). There are also cases where the selection can act directly on traits, such as growth and reproduction. For example, a rapid growth and early reproduction can reduce the internal concentration of pollutant by dilution and allow some reproduction before the damages of the pollutants are too high (Sibly & Calow, 1989). However, in the absence of the pollutant these strategies may not be the most optimal. Evidences are increasing of costs of adaptation to pollutants in multigenerational experiments (Shirley & Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Wang *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b).

The occurrence of adaptation costs and their detection will depend on (i) the similarity of selection pressures between the previous and the novel environment (Travisano & Lenski, 1996 ; Jasmin & Kassen, 2007), (ii) the intensity of selection (Anderson *et al.*, 2003). We also assume that (iii) trade-offs between the measured traits may constrain their independent evolution and thus lead to potential adaptation costs. For example, the evolution of one trait could entail a cost of adaptation on other, genetically correlated, traits (Falconer & Mackay, 1996 ; Roff, 2002b ; Roff & Fairbairn, 2007). Furthermore, fundamental trade-offs have more chance to be perceptible than trade-offs between traits less related to fitness. This is the case in the trade-off between growth rate and yield of *Escherichia coli* populations (Novak *et al.*, 2006). For all these reasons, costs are not

systematically found (see Coustau *et al.*, 2000 ; Reznick *et al.*, 2000 ; McCart *et al.*, 2005 ; Lopes *et al.*, 2008). Consequently, it becomes necessary to compare the effects of different (i) previous polluted environment of evolution and (ii) novel stressful environments on the existence of adaptation costs to define a comprehensive and predictive framework.

Experimental studies on the costs of adaptation generally focus on costs induced by the evolution in response to a single stressor (e.g. Ward & Robinson, 2005 ; Lopes *et al.*, 2008) or to a combination of stressors (e.g. Jasmin & Kassen, 2007 ; Jansen *et al.*, 2011a). Comparatively, few studies on the evolution in a heterogeneous environment have been proposed yet (see Turner & Elena, 2000 ; Reed *et al.*, 2003 for temporal heterogeneity), despite the fact that they probably reflect more natural conditions (Levins, 1968 ; Hedrick, 1974, 1976, 1986). Furthermore, environmental heterogeneity is assumed to help maintaining a higher level of genetic variation (Hedrick, 1986 ; Roff, 2002b). In such a heterogeneous environment, populations may not reach the same level of adaptation (but see Turner & Elena, 2000), but they may also suffer lower costs of adaptation than if they were evolving in a homogeneous environment (Reed *et al.*, 2003). It is thus necessary to conduct more studies comparing the evolutionary responses of populations to constant and fluctuating selection pressures.

Using an experimental evolution approach on *Caenorhabditis elegans*, we test in this study the hypothesis that adaptation to different polluted environments entails differential fitness costs in original (i.e. control) or novel stressful environments. We first ran a multigenerational experiment in which populations evolved for 22 generations in response to either a constant presence of uranium (U), high sodium chloride (NaCl), or U and NaCl alternating every generation (alternating environment). Then, we compared

the performance (i.e. value of several phenotypic traits such as survival, fertility or growth) of populations from each pollution (i.e. uranium, salt or alternating treatments) with the control populations by putting these populations back into the original environmental conditions (common-garden experiment: Conover & Schultz, 1995). In principle every reduction of performance in the treatment populations compared to the control ones would reveal a fitness costs related to the genetic differentiation that took place through time (e.g. Shirley & Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Schulte *et al.*, 2010). We also submitted populations to a fast temperature increase (i.e. 5°C) to evaluate the adaptive costs of populations submitted to another type of stress than pollution. Fast temperature increase is a stress that many natural populations will cope with at an increasing rate in the near future (Root *et al.*, 2003 ; IPCC, 2007). Furthermore, we ran a reciprocal-transplant experiment (e.g. Hassel *et al.*, 2005 ; Iraeta *et al.*, 2006) in which we compared the performances of individuals from the four different treatments when transferred in uranium or salt environments (Figure 20A). In principle, we should expect that the fitness performance of each population should be higher in its evolved environment. Similar fitness performances in another novel environment (e.g. salt) than in the evolved environment (e.g. uranium) may indicate that adaptation to a given environment can have positive fitness effects in presence of another stressor (Figure 20B). In contrast, a fitness performance that is lower in the alternative novel environment compared to the evolved and the control environment may indicate that adaptation to a novel environment is associated to a cost in the ability of the population to cope with another stressor. Finally, to see the dynamics of appearance of costs through evolution, we measured the costs in original environmental conditions at several times of the multigenerational experiment. These experiments allowed us to identify whether costs of adaptations to a given stressor (pollutant) exist, but more importantly whether they appear on the same traits, in the same novel environments and

at the same time depending on the pollutant (uranium or salt) and the type of pollution (constant or alternating).

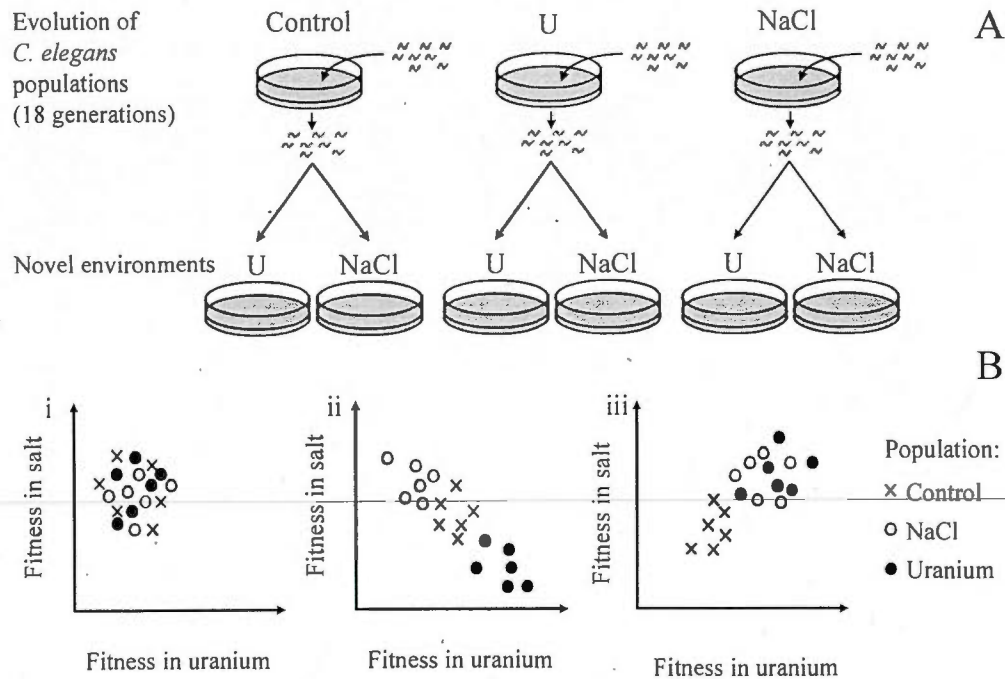


Figure 20. Reciprocal-transplant experiment design and potential responses.

In (A): Schematic overview of the reciprocal-transplant experiment design (A). First, populations lived 18 generations in a given environment (here we illustrate the experiment using control, uranium (U), and salt (NaCl) environments only). Second, each population was placed in their own environment and the other environments (e.g. here uranium, salt). In (B): Potential relationships for each population between the trait value (or fitness) measured in one environment (i.e. NaCl) as a function of the trait value measured in the other environment (i.e. U). Populations that have evolved in the control, in the uranium and in the salt environments are represented by crosses, black dots, and empty dots, respectively (each mark is the measure for an individual). (i) no evidence of adaptation; (ii) costs of adaptation to one pollutant in presence of the other pollutant so control population have a intermediate fitness in presence of each pollutant; (iii) benefit of adaptation to one pollutant in the other and vice versa, so control population have a lower fitness than other populations.



## 2. Material and methods

### 2.1. Population maintenance and prior environment of evolution

Because of its short life cycle, small body length, and ease of handling, *C. elegans* represents a good metazoan model to perform microevolution experiments (Braendle *et al.*, 2008). To obtain a study population with a large genetic diversity, we used in this study a stock population of *C. elegans* composed of a mixture of 16 wild isolates (Teotónio *et al.*, 2012). The population was kept in the experimental conditions described in Teotónio *et al.* (2012) for over 140 generations prior to our study. During the experiment we changed the conditions (see article III). Briefly, we placed 500 individuals in a 9 cm diameter Petri plate filled with an agar medium seeded with 1 ml UV-killed *Escherichia coli* OP50 strain as food source. After three days of population development we transferred 500 individuals from all developmental stages into a new Petri plate. We produced six replicated experimental populations. Generation time in *C. elegans* (i.e. time to complete a life cycle) is lower than three days (Byerly *et al.*, 1976). The population was composed of males for an androdioecious breeding system (i.e. self-fertilization of hermaphrodites and facultative outcross with males). Nematodes were cultured throughout the experiment at 20°C and 80% of relative humidity.

### 2.2. Selection experiment

For this experiment we chose to use uranium and salt environment as stressors. Uranium is a natural radioactive heavy metal which concentrations in sediments or surface soils have increased recently as a result of human activities such as mining (UNSCEAR, 2000 ; Lottermoser *et al.*, 2005). Exposure to natural uranium may induce both chemical and radiological effects, although uranium is assumed to have relatively higher chemotoxic



than radiotoxic effects (Thomas & Liber, 2001 ; Kuhne *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2002 ; Zeman *et al.*, 2008 ; Mathews *et al.*, 2009). Salt concentration has increased recently in ecosystems, for many reasons, the most important one being the intensive irrigation of some cultivated lands (Rengasamy, 2006 ; Verwey & Vermeulen, 2011). High salt exposure is an extreme hypertonic stress that provokes a rapid water and solute content loss in cells of *C. elegans* (Lamitina *et al.*, 2004).

After repeating this protocol for about 40 generations, the individuals from the six replicates were mixed before being transferred into four different environmental conditions: a control environment (as described above) and three polluted environments, identical in all aspects to the control, except for the addition in the agar medium of (i) 1.1 mM of uranium (uranyl nitrate:  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich, France), (ii) 308 mM NaCl or (iii) alternating uranium and salt at each generation (salt for odd generations). For each type of environment we created six replicate populations of 500 individuals each. Thereafter we will refer to different population evolving in these environments as control, uranium, salt and alternating populations. Uranium and salt concentrations entailed a reduction of fertility about 60% at the first generation of exposition, which corresponds to potentially strong selection pressures. We previously described how we added pollutant in the agar medium (article III). Generation time, however, varied between the treatments. In particular, it was delayed in the NaCl-treatment compared to the other treatments, and therefore depending on the treatment, each experimental iteration (i.e. three days) may correspond to either a generation or a bit less than a generation. However, to simplify we kept using the term generation throughout the text. Here, we present measured of phenotypic traits at three different generations to observe the effects of treatments at the beginning (generation 1) and at the end (generation 22) of the experiment. Moreover, we decided to focus on genetic

differentiations among populations and not to changes caused by within-individual (Scheiner, 1993) or to cross-generation phenotypic (i.e. maternal effects; Räsänen & Kruuk, 2007) plastic response to the novel environment. We thus show the results starting at the fourth generation.

### 2.3. Common-garden and reciprocal-transplant experiments

Our objective was to estimate the costs of adaptation to uranium, salt, and the alternating treatment. Thus starting from generation 6 of the multigenerational experiment, and then every three generations, we isolated 500 individuals from each replicate to run a common-garden experiment by putting the individuals from each replicate and for each treatment back into the control environment. Differences observed in the control environment between the populations that have evolved in different prior environments can be attributed to genetic changes caused by the evolution during the multigenerational experiment (Levins, 1968 ; Conover & Schultz, 1995).

At generation 18, we ran a reciprocal-transplant experiment in which samples of each replicate population from each treatment were transferred into uranium and salt environments. A negative interaction between the prior environment and the transplant environment on the trait measured should reveal some costs of adaptation to the prior environment (see below statistical analyses).

Finally, at the end of the multigenerational experiment (i.e. generation 23), we realized one last common-garden experiment similar to the previous ones in all the conditions, with the exception that we placed the populations in incubators at two different

temperatures: 20°C (i.e. similar to the control one in previous experiments) and 25°C. Such an increase provokes a reduction of development time and fertility and an increase of speed growth in *C. elegans* (Byerly *et al.*, 1976). Additional reduction of fitness at 25°C for populations that lived previously in polluted environment compared to control populations should affect the ability to deal with an environmental stress.

The costs had to be measured at least after two generations to overcome effects caused by different parental environments (Mousseau *et al.*, 2009 ; Kawecki *et al.*, 2012). Thus as mentioned above for generation 4 of selection experiment, prior to all measures of phenotypic traits each population spent three generations in the control or novel environment (same transfer at each generation than in the selection experiment) to ensure that the responses observed were due to the genetic differentiations.

#### 2.4: Phenotypic measures

To measure survival and sex ratio after 48h, we transferred approximately 100 eggs from the given generation into another Petri plate, containing the same medium that the replicate population was experiencing. From this sample we picked up three hermaphrodites per replicate randomly and measured their early (i.e. before 96h) and late (i.e. after 96h) brood size (thereafter referred to as early and late fertility, respectively). The sum of early and late brood size gave us an index of total fertility during the overall life of a hermaphrodite. We measured body bend frequency on 3 males per replicate at age 96 h, which corresponds to locomotion behaviour. Locomotion allows males and hermaphrodites to find good living conditions, but also affect male encounter rate with hermaphrodites, which is essential for males reproduction and fitness (Pannell, 2002 ; Barrière & Félix, 2005a). At age 96h these males and hermaphrodites were

photographed, using a stereomicroscope (Olympus SZX12, 1.6 x 90 magnification) with a computer-connected camera (Nikon D5000). From these pictures we measured body length that we used as an index of growth from age 0 to 96h. Because of faster growth of individuals at 25°C, we chose 72h for the separation between early and late fertility and morphological measurements, for the last common-garden experiment. Moreover, we were not able to count body bend at 25°C since we needed to change the room temperature to do it. The conditions of medium, quantity of food and how we precisely measured the traits was also previously described (article III).

## 2.5. Statistical analysis

We compared the different treatments using separate statistical models for hermaphrodites and males. We used a generalized linear mixed effects model (GLMM) approach implemented within a Bayesian Monte Carlo Markov Chain (MCMC) framework (Hadfield, 2010) in the R software (R Development Core Team, 2012).

In a first univariate mixed-effect model we tested the effects of environment and generation (i.e. Generation 1, 4, and 22) on the fitness of the population (calculated as total fertility over three hermaphrodites multiplied by survival rate of the replicate), and using replicate as a random effect. We then ran mixed models for the data on common-garden and reciprocal transplant experiments. Here again replicate within each treatment was included as a random effect in the model to control for the pseudo-replication issues. We constructed quadrivariate models for hermaphrodite traits (early, late and total fertility, and growth), bivariate models for male traits (growth and body bend), and a univariate model to analyse hermaphrodite growth in the last common-garden at two different temperatures. In the common-garden experiment analysis prior environment



(i.e. the environment in which the population has evolved) and generation (i.e. the generation at which the experiment was done) were included as fixed effects. In the reciprocal-transplant models and the last common-garden at different temperatures we added novel environment as a fixed effect.

We chose a Gaussian error structure for all the other traits. For multivariate analyses, we allowed models to estimate covariances or not between the pairs of traits. To avoid any bias in the results caused by mean trait differences, we rescaled the traits prior to analysis by subtracting each value by the mean of the sample and dividing it by twice the standard deviation (Gelman, 2008). After several priors tested, we retained a slightly informative but proper prior ( $\nu = k - 1 + 0.002$ ) with a low variance parameter ( $V = \text{diag}(k) * V_p * 0.05$ ), where  $V_p$  is the phenotypic variance,  $k$  the dimension of  $V$  (e.g. number of traits). After verifying for the convergence of parameters values (i.e. number of iterations, burn-in phase and thinning) and autocorrelation issues, we retained 120 000 iterations with a burn-in phase of 20 000, for a total of 1 000 samples for each analysis (Hadfield, 2010).

We tested models including different fixed effects and selected the best-fitted model by comparing the deviance information criterion (DIC) of each model. A lower DIC signals a better fit of the model, and a difference in DIC of less than 5 indicates that the two models show similar fits (Spiegelhalter *et al.*, 2007). For each series of models, when two models have DICs within a range of 5, we retained the most parsimonious (i.e. with the lowest number of parameters).



In all models we used the posterior distribution for traits that allow estimates of confidence intervals around their estimates. For common-garden experiments, we used the posterior mode of the distribution for intercept and also for slope of each treatment as a function of generation number (note that generation was used as a continuous variable). With these two parameters we were able to model the linear regression for each prior environment and each trait. We considered two parameters to show "significant different" when the 95% interval of highest posterior density (HPDI) did not overlap 0, even if with a Bayesian approach significance reflect more a difference that is considered as non negligible (differ from the significance level commonly used in a frequentist approach). To compare a trait in two conditions, we checked whether 95% HPDI of the difference between the whole posterior distributions of the trait for the two conditions overlaps 0.

In the multigenerational experiment we predicted lower trait values in each stressful environment compared to the control one in the first generations. We also predicted that values in each stressful environment will improve with time and that difference between each stressful environment and the control will decrease at the end of the experiment (indicating a potential evolutionary response in the stressful environment). A genetic differentiation caused by differential evolution each stressful environment and the control should be revealed in the common garden experiments by a difference between the intercept of the values of the trait in each stressful environment and the control. Furthermore, we expected an increase over time in the genetic differentiation between populations experiencing different treatments, revealed by differences between the slopes of the trait values as a function of the treatment. In the reciprocal-transplant experiment, we looked traits values of the populations that have evolved in the different environments (i.e. three treatments and the control) when they were placed in the two

novel environments (i.e. uranium or salt). More precisely, we predicted that populations showing the highest trait value in one environment should be the ones that had previously evolved in that environment. In contrast, these populations should show lower trait values in the other environment, indicating a cost of adaptation to the previous environment, and the control populations should have value between that of the other populations (Figure 20Bii). In the last common-garden experiment with the two different temperature treatments, we predicted a negative effect of high temperature on trait values and a stronger effect for populations that had evolved in the stressful environment compared to control.

### 3. Results

#### 3.1. Multigenerational experiment

The model for fitness with the smaller DIC included the interaction between environment and generation (Table 10A). Thus, fitness changes across generations depended on the type of environment. Fitness did not change through time in the control environment (Table 11 and Figure 21). Compared to the control populations, in all the replicate populations, fitness decreased directly (i.e. generation 1) after the population was introduced in uranium, salt, or the alternating U/NaCl treatment (Table 11 and Figure 21). During the first four generations, fitness increased in the uranium and the alternating treatments but not in the salt treatment. Fitness increased between generation 4 and 22 in the salt and in the alternating treatments but not significantly in the uranium treatment. At generation 22, fitness was still weaker in the three novel environments than in the control.

### 3.2. Common-garden experiments

Changes observed between the successive common-garden experiments performed all along the multigenerational experiment represent genetic changes in each trait with time (Table 12 and Figure 22).

The model selected for hermaphrodite traits included an interaction between prior environment and generation (Table 10B). This interaction indicated that the changes in the average value of the traits across generations depended on the prior environment in which the population has evolved. The model allowing a covariance component between traits was associated with a better fit than the model without covariance. None of the traits measured in the control populations changed with time, indicating an absence of uncontrolled evolutionary change in that environment during the experiment (Table 12A and Figure 22A). Total fertility of salt populations was similar to the control populations in the first common garden (i.e. intercept in Table 12A), but it showed a strong decrease across generations relative to control populations (Figure 22A). In contrast, total fertility of uranium and alternating populations was affected at the first generation, but then showed a steady increase across generations relative to that of control populations (the slope for total fertility of uranium populations almost overlapped 0, Table 12A). Slope for early fertility was positive for uranium populations (Table 12A and Figure 22C). Uranium and alternating populations had a lower growth compared to control populations in the first common-garden, but then they showed stronger slopes of growth over the successive common-garden experiments (Table 12A and Figure 22B).

Table 10. Comparison of models for traits measured in the different experiments.

Fitness (fertility multiplied by survival frequency) measured in the multigenerational experiment done at generation 1, 4, and 22 (A); hermaphrodite traits (total, early, and late fertility, and growth) or male traits (growth and body bend frequency) measured in common-garden experiments in control environment done at generation 6, 9, 12, 15, and 18 (B); in the reciprocal-transplant experiment done at generation 18 (C); and in the common-garden experiment at two different temperatures done at generation 23 (D). For the latter experiment we did not measure body bend frequency of males. Environment (or prior environment) corresponds to the environment in which the population has been evolving (i.e. control, uranium, salt or U/NaCl alternating treatment) and this effect was present in the models for all experiments (A to D). Generation corresponds to the generation for which we measured traits in multigenerational and common-garden experiments (A, B). Novel environment corresponds to the environment of transplant in the reciprocal-transplant experiment (C). Temperature corresponds to the temperature for which we measured traits in the common-garden experiment at two different temperatures (D). We used multivariate (or univariate in A and for male trait in D) mixed models with all the traits included as dependent variables, and compared different models using deviance information criterion (DIC). All the models contained replicates included as a random effect to control for independence of data across generations. The first DIC value corresponds to a simple model including only replicates as a random effect, and the subsequent value correspond to the associated change ( $\Delta$ ) in DIC estimates that occurs when the effect is included within the model. Except for the models shown at the last line for each sex (and univariate models), covariance (cov) between traits was allowed in the priors. In bold, models for which  $\Delta\text{DIC} > 5$ , i.e. the models that had a smaller DIC, for which the replicate effect for hermaphrodite and male traits was written below table.

## A - Multigenerational experiment

| Effect included within the model | DIC            | $\Delta$ DIC   |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| for hermaphrodite traits         |                |                |
| -                                | 24.538         | -              |
| environment                      | -10.864        | -35.402        |
| environment + generation         | -36.198        | -25.334        |
| <b>environment x generation</b>  | <b>-65.714</b> | <b>-29.516</b> |
| Replicates effect: 0.0%          |                |                |

## B - Common-garden experiments in control environment

| Effect included within the model                          | DIC             | $\Delta$ DIC   |
|---|-----------------|----------------|
| for hermaphrodite traits                                  |                 |                |
| -   | -704.829        | -              |
| prior environment   | -721.353        | -16.524        |
| prior environment + generation                            | -739.623        | -18.270        |
| <b>prior environment x generation</b>                     | <b>-744.419</b> | <b>-4.796</b>  |
| prior environment x generation (no cov)                   | 1585.925        | 2330.344       |
| for male traits   |                 |                |
| -   | 1046.823        | -              |
| prior environment   | 1041.722        | -5.101         |
| prior environment + generation                            | <b>1023.955</b> | <b>-17.767</b> |
| prior environment x generation                            | 1025.881        | 1.926          |
| prior environment x generation (no cov)                   | 1024.779        | -1.102         |
| Replicates effect: 2.3% (hermaphrodites) and 2.0% (males) |                 |                |

## C - Reciprocal-transplant experiment

| Effect included within the model                          | DIC              | $\Delta$ DIC   |
|---|------------------|----------------|
| for hermaphrodite traits                                  |                  |                |
| -   | -654.464         | -              |
| novel environment   | -1101.912        | -447.448       |
| novel environment + prior environment                     | -1117.402        | -15.490        |
| <b>novel environment x prior environment</b>              | <b>-1172.517</b> | <b>-55.115</b> |
| novel environment x prior environment (no cov)            | -2.699           | 1169.818       |
| for male traits   |                  |                |
| -   | 600.821          | -              |
| novel environment   | 422.846          | -177.975       |
| novel environment + prior environment                     | 401.901          | -20.945        |
| novel environment x prior environment                     | 378.241          | -23.660        |
| <b>novel environment x prior environment (no cov)</b>     | <b>376.365</b>   | <b>-1.876</b>  |
| Replicates effect: 5.2% (hermaphrodites) and 3.0% (males) |                  |                |

## D - Common garden at two different temperatures

| Effect included within the model                          | DIC             | $\Delta$ DIC   |
|---|-----------------|----------------|
| for hermaphrodite traits                                  |                 |                |
| -   | -102.965        | -              |
| temperature   | -316.462        | -213.497       |
| <b>temperature + prior environment</b>                    | <b>-327.095</b> | <b>-10.633</b> |
| temperature x prior environment                           | -313.615        | 13.48          |
| temperature x prior environment (no cov)                  | 362.631         | 676.246        |
| for male traits   |                 |                |
| -   | 191.799         | -              |
| <b>temperature</b>  | <b>179.448</b>  | <b>-12.351</b> |
| temperature + prior environment                           | 176.924         | -2.524         |
| temperature x prior environment                           | 180.872         | 3.948          |
| Replicates effect: 8.3% (hermaphrodites) and 0.6% (males) |                 |                |



Table 11. Analyses of differences of fitness (i.e. total fertility multiplied by survival frequency) in multigenerational experiment of selection between generation 1 and 4 and then between generation 4 and 22.

Values correspond to the estimation of fitness, using the posterior mode of the distribution of rescaled fitness, and the limits of the 95% highest posterior density interval (HPDI: between brackets), in control and in the prior stressful (uranium, salt and alternating uranium and salt) environments relative to the control. Values in bold are those for which the 95% HPDI did not overlap 0.

| Comparison of fitness | Control                   | Uranium                           | Salt                              | Alternating U/NaCl                |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Generation 1 - 4      | -0.025 [ -0.173 ; 0.141 ] | <b>-0.255 [ -0.440 ; -0.119 ]</b> | 0.042 [ -0.109 ; 0.200 ]          | <b>-0.382 [ -0.553 ; -0.249 ]</b> |
| Generation 4 - 22     | 0.079 [ -0.089 ; 0.220 ]  | <b>-0.137 [ -0.321 ; 0.014 ]</b>  | <b>-0.237 [ -0.396 ; -0.082 ]</b> | <b>-0.262 [ -0.404 ; -0.092 ]</b> |

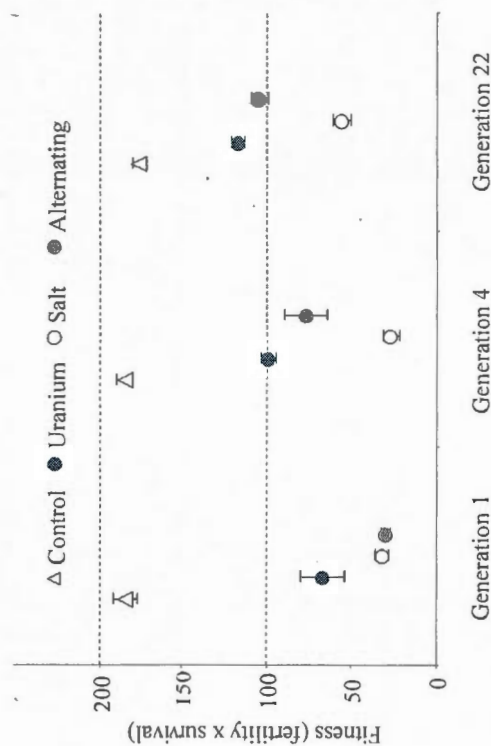


Figure 21. Fitness (i.e. total fertility multiplied by survival frequency) at generation 1, 4 and 22 in the multigenerational experiment. Symbols represent the mean and its associated standard errors over the 6 replicated populations in each treatment: control = empty triangle; uranium = filled black dots; salt = empty dots; alternating U/NaCl treatment = filled grey dots.



Table 12. Analyses of difference of traits values for hermaphrodites (A) and males (B) in five successive common-garden experiments in control environment conducted at generation 6, 9, 12, 15 and 18 of the multi-generation experiment.

Intercept corresponds to the rescaled traits value at the first common-garden (generation 6) and slope corresponds to the slope of linear regressions across generations. Values correspond to the estimation given by the posterior mode of the distribution for each parameter (i.e. intercept and slope) in control or for each parameter relative to the control in the prior stressful (uranium, salt and alternating uranium and salt) environments, except slope for male traits (one estimation for all prior environments). Values between brackets correspond to the limit of the 95% highest posterior density interval (HPDI). Values in bold are those for which the 95% HPDI did not overlap 0.

| A                                  |                              |                                 |                                 |                                 |  |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Parameter analysed                 | Control                      | Uranium                         | Salt                            | Alternating U/NaCl              |  |
| Intercept                          |                              |                                 |                                 |                                 |  |
| Total fertility                    | <b>0.596</b>   0.255 ; 0.911 | <b>-1.121</b>   -1.615 ; -0.690 | -0.145   -0.655 ; 0.260         | <b>-1.130</b>   -1.558 ; -0.690 |  |
| Early fertility                    | <b>0.451</b>   0.140 ; 0.822 | <b>-1.206</b>   -1.738 ; -0.775 | -0.214   -0.674 ; 0.267         | <b>-0.961</b>   -1.445 ; -0.507 |  |
| Late fertility                     | 0.365   -0.063 ; 0.763       | -0.331   -0.917 ; 0.152         | 0.014   -0.537 ; 0.547          | <b>-0.584</b>   -1.118 ; -0.060 |  |
| Growth                             | -0.071   -0.438 ; 0.289      | <b>-0.947</b>   -1.450 ; -0.464 | 0.070   -0.472 ; 0.566          | <b>-0.697</b>   -1.196 ; -0.156 |  |
| Slope                              |                              |                                 |                                 |                                 |  |
| Total fertility                    | -0.005   -0.026 ; 0.016      | 0.024   -0.005 ; 0.052          | <b>-0.028</b>   -0.057 ; -0.002 | <b>0.026</b>   0.001 ; 0.053    |  |
| Early fertility                    | 0.001   -0.021 ; 0.021       | <b>0.031</b>   0.002 ; 0.061    | -0.019   -0.049 ; 0.009         | 0.019   -0.011 ; 0.049          |  |
| Late fertility                     | -0.008   -0.032 ; 0.019      | 0.003   -0.030 ; 0.039          | -0.019   -0.054 ; 0.015         | 0.016   -0.019 ; 0.048          |  |
| Growth                             | 0.004   -0.017 ; 0.029       | <b>0.056</b>   0.026 ; 0.088    | 0.006   -0.026 ; 0.039          | <b>0.045</b>   0.013 ; 0.080    |  |
| B                                  |                              |                                 |                                 |                                 |  |
| Parameter analysed                 | Control                      | Uranium                         | Salt                            | Alternating U/NaCl              |  |
| Intercept                          |                              |                                 |                                 |                                 |  |
| Growth                             | -0.226   -0.431 ; -0.015     | <b>-0.359</b>   -0.548 ; -0.209 | -0.127   -0.318 ; 0.027         | <b>-0.227</b>   -0.393 ; -0.071 |  |
| Body Bend                          | -0.044   -0.269 ; 0.175      | -0.051   -0.223 ; 0.130         | -0.072   -0.243 ; 0.102         | -0.047   -0.215 ; 0.135         |  |
| Slope (for all prior environments) |                              |                                 |                                 |                                 |  |
| Growth                             | <b>0.027</b>   0.016 ; 0.038 | -                               | -                               | -                               |  |
| Body Bend                          | 0.005   -0.007 ; 0.018       | -                               | -                               | -                               |  |

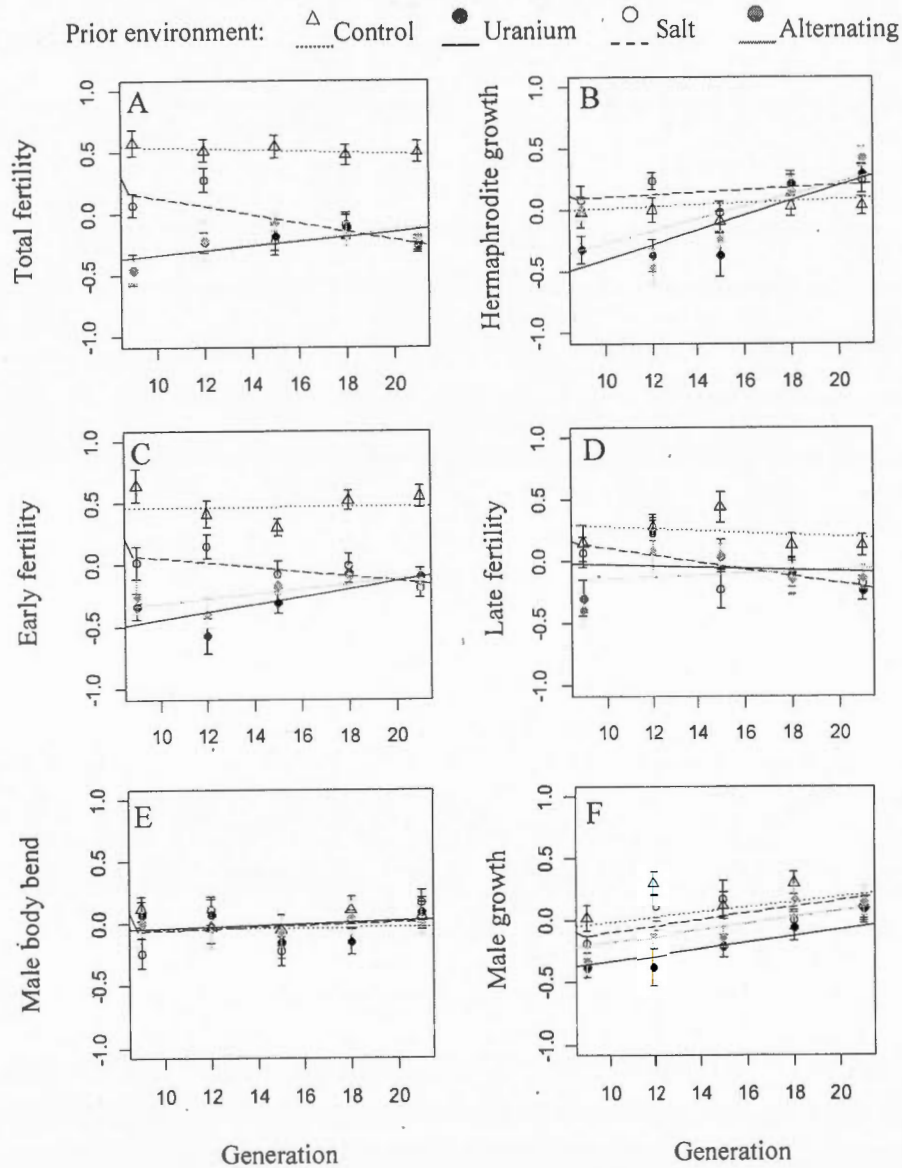


Figure 22. Total fertility (A), hermaphrodite growth (B), early fertility (C), late fertility (D), male body bend (E) and male growth (F) during five successive common-garden experiments conducted at generation 6, 9, 12, 15 and 18 of the multi-generation experiment.

Traits (rescaled) were measured after individuals have spent three generations in the control environment. Symbols represent the mean and its associated standard error for 18 randomly sampled individuals in each treatment. Control = empty triangle; uranium = filled black dots; salt = empty dots; alternating U/NaCl treatment = filled grey dots. Regression lines correspond to posterior mode of the distribution for intercept and slope for each treatment: control = small dashed line; uranium = black line; salt = large dashed line; alternating U/NaCl treatment = grey line.

For male traits the best-fitted model did not include the interaction between prior environment and generation, indicating an absence of evolution in male traits leading to sufficient genetic differentiation between the treatments (Table 10B). There was a reduction of male growth from the first common-garden for uranium and alternating populations and a significant positive slope for all populations, indicating a stronger growth in all treatment over the successive common-garden experiments (Table 12B and Figure 22F). However, a test with a model with interaction between prior environment and generation showed a significant slope only for uranium and alternating populations and not for control populations (data not shown). We saw any effect on body bend (Table 12B and Figure 22E).

### 3.3. Reciprocal-transplant experiment

For traits in hermaphrodites, the model with the smaller DIC was the one that included covariance between traits and an interaction between prior and novel environment (Table 10C). Therefore, trait expression in the novel environment depended on the environment populations had previously evolved in.

Total fertility in uranium was similar between populations from prior control, prior uranium, and prior alternating environment (Table 13 and Figure 23A), whereas prior salt populations showed a reduced total fertility compared to the populations that had evolved in these three other prior environments. In contrast, in the novel salt environment, prior alternating and salt populations showed higher values of fertility than prior uranium or control populations (Table 13 and Figure 23A). The same patterns were found for late fertility (Table 13 and Figure 23D). However, for early fertility, control populations showed intermediate values between salt and uranium environments in the

novel uranium environment, and control populations showed lower values of early fertility than uranium populations and equivalent value than salt populations in the novel salt environment (Table 13 and Figure 23C). Overall, populations that had evolved in the alternating environment showed the highest total fertility in both of the two stressful environments: hermaphrodites from these populations produced on average more than 95 larvae against 80-86 larvae for the prior control, uranium, and salt populations.

Prior uranium and alternating populations produced bigger individuals at 96h than prior control populations in both the uranium and the salt environments, and prior salt populations did not differ from the prior control populations in both novel environments (Table 13 and Figure 23B).

The model with the smaller DIC for the male traits was the one including an interaction between prior and novel environment and with no covariance between traits (Table 10C). Prior uranium populations produced bigger males than the three other types of populations in both salt and uranium environment (Table 13 and Figure 23F). Prior control populations showed the smallest males in the salt environment.

Individuals of prior salt populations showed a smaller frequency of body bends in the uranium environment, whereas the three other types of population did not differ with each other (Table 13 and Figure 23E). No differences in body bends were observed between the different types of populations in the salt environment.

### 3.4. Common-garden experiment at different temperatures

In hermaphrodites no interaction was detected between temperature (20 and 25°C) and prior environment (Table 10D). In other words, the effects of prior environments on traits were the same at both temperatures. Compared to 20°C, at 25°C all the populations lowered their total fertility and shortened their reproductive longevity; almost 90% of eggs were produced before 72h (Table 14 and Figure 24A, C and D). Hermaphrodites also grew up faster, whatever their population of origin (Table 14 and Figure 24B). Independent of the temperature, control and salt population showed the highest early fertility values, followed by both uranium and alternating populations. Patterns were less clear for late fertility, and total fertility showed a marked difference between the control and the other populations.

Male growth was not affected by prior environments, and increasing temperature reduced growth in males (Table 10D, Table 14 and Figure 24E).

### 3.5. Replicate effects

Differences between replicate populations represented between 0 and 8.3% of the overall trait variation (Table 10), indicating that the random sampling of the individuals that founded the different populations was appropriate.



Table 13. Analyses of difference of traits values between the populations that previously lived in the control or stressful (uranium, salt or alternating uranium and salt) environments for hermaphrodites and males, and in each novel environment (i.e. uranium or salt). It corresponds to the reciprocal-transplant experiment at generation 18. Values correspond to the estimation of traits, using the posterior mode of the distribution of rescaled traits, and the limits of the 95% highest posterior density interval (HPDI: between brackets). Values in bold are those for which the 95% HPDI did not overlap 0.

| Comparison          | Hermaphrodite traits                         |   |                            |   |   |   | Male traits |        |
|---------------------|--|---|----------------------------|---|---|---|-------------|--------|
|                     | Total fertility                              | Early fertility                                 | Late fertility             | Growth  | Body bend                                       | Growth  | Male trait  | Growth |
| In uranium          |  |   |                            |   |   |   |             |        |
| Control-Uranium     | -0.086 [ -0.193 ; 0.107 ]                    | <b>-0.143</b> [ <b>-0.234</b> ; <b>-0.047</b> ] | 0.212 [ -0.100 ; 0.419 ]   | <b>-0.201</b> [ <b>-0.347</b> ; <b>-0.050</b> ] | 0.005 [ -0.246 ; 0.261 ]                        | <b>-0.263</b> [ <b>-0.465</b> ; <b>-0.077</b> ] |             |        |
| Control-Salt        | <b>0.209</b> [ <b>0.082</b> ; <b>0.385</b> ] | 0.113 [ 0.031 ; 0.210 ]                         | 0.296 [ 0.019 ; 0.549 ]    | -0.077 [ -0.196 ; 0.108 ]                       | <b>0.261</b> [ <b>0.073</b> ; <b>0.586</b> ]    | 0.176 [ -0.025 ; 0.396 ]                        |             |        |
| Control-Alternating | 0.039 [ -0.082 ; 0.224 ]                     | -0.075 [ -0.167 ; 0.019 ]                       | 0.193 [ -0.005 ; 0.531 ]   | <b>-0.177</b> [ <b>-0.313</b> ; <b>-0.016</b> ] | -0.123 [ -0.428 ; 0.104 ]                       | 0.074 [ -0.134 ; 0.271 ]                        |             |        |
| Uranium-Salt        | <b>0.309</b> [ <b>0.139</b> ; <b>0.436</b> ] | 0.255 [ 0.176 ; 0.354 ]                         | 0.073 [ -0.148 ; 0.369 ]   | 0.137 [ -0.018 ; 0.281 ]                        | <b>0.296</b> [ <b>0.042</b> ; <b>0.558</b> ]    | <b>0.449</b> [ <b>0.255</b> ; <b>0.657</b> ]    |             |        |
| Uranium-Alternating | 0.112 [ -0.037 ; 0.267 ]                     | 0.071 [ -0.022 ; 0.159 ]                        | 0.082 [ -0.138 ; 0.386 ]   | 0.018 [ -0.112 ; 0.188 ]                        | -0.159 [ -0.402 ; 0.136 ]                       | <b>0.320</b> [ <b>0.159</b> ; <b>0.546</b> ]    |             |        |
| Salt-Alternating    | -0.159 [ -0.318 ; -0.006 ]                   | -0.195 [ -0.279 ; -0.102 ]                      | 0.113 [ -0.240 ; 0.308 ]   | -0.127 [ -0.269 ; 0.043 ]                       | <b>-0.414</b> [ <b>-0.753</b> ; <b>-0.209</b> ] | -0.158 [ -0.323 ; 0.088 ]                       |             |        |
| In salt             |  |   |                            |   |   |   |             |        |
| Control-Uranium     | -0.064 [ -0.205 ; 0.088 ]                    | -0.115 [ -0.231 ; -0.040 ]                      | 0.139 [ -0.126 ; 0.385 ]   | <b>-0.222</b> [ <b>-0.366</b> ; <b>-0.055</b> ] | -0.041 [ -0.396 ; 0.140 ]                       | <b>-0.708</b> [ <b>-0.932</b> ; <b>-0.514</b> ] |             |        |
| Control-Salt        | -0.244 [ -0.371 ; -0.067 ]                   | -0.100 [ -0.173 ; 0.012 ]                       | -0.321 [ -0.588 ; -0.062 ] | -0.038 [ -0.178 ; 0.123 ]                       | -0.015 [ -0.367 ; 0.189 ]                       | <b>-0.352</b> [ <b>-0.554</b> ; <b>-0.172</b> ] |             |        |
| Control-Alternating | -0.403 [ -0.533 ; -0.249 ]                   | -0.214 [ -0.295 ; -0.113 ]                      | -0.393 [ -0.641 ; -0.134 ] | <b>-0.272</b> [ <b>-0.415</b> ; <b>-0.103</b> ] | -0.181 [ -0.459 ; 0.078 ]                       | <b>-0.427</b> [ <b>-0.630</b> ; <b>-0.235</b> ] |             |        |
| Uranium-Salt        | -0.140 [ -0.315 ; -0.010 ]                   | 0.046 [ -0.034 ; 0.161 ]                        | -0.443 [ -0.667 ; -0.120 ] | 0.189 [ 0.030 ; 0.338 ]                         | 0.050 [ -0.229 ; 0.299 ]                        | <b>0.420</b> [ <b>0.186</b> ; <b>0.587</b> ]    |             |        |
| Uranium-Alternating | -0.324 [ -0.478 ; -0.177 ]                   | -0.096 [ -0.165 ; 0.016 ]                       | -0.515 [ -0.744 ; -0.220 ] | -0.045 [ -0.204 ; 0.107 ]                       | -0.098 [ -0.356 ; 0.173 ]                       | <b>0.287</b> [ <b>0.091</b> ; <b>0.507</b> ]    |             |        |
| Salt-Alternating    | -0.139 [ -0.324 ; -0.012 ]                   | -0.141 [ -0.222 ; -0.034 ]                      | -0.057 [ -0.350 ; 0.194 ]  | -0.215 [ -0.383 ; -0.072 ]                      | -0.201 [ -0.394 ; 0.158 ]                       | -0.065 [ -0.260 ; 0.131 ]                       |             |        |

Table 14. Analyses of difference of traits values between the populations that previously lived in the control or stressful (uranium, salt or alternating uranium and salt) environments for hermaphrodites and males, and at 25°C. It corresponds to the common-garden experiment at two different temperatures. Values correspond to the estimation given by the posterior mode of the distribution of rescaled traits at 25°C between two prior environments (hermaphrodites) or for all prior environments (males). Slope corresponds to the slope of linear regressions between traits values at each temperature (from 25 to 20°C) for all prior environments. Values between brackets correspond to the limit of the 95% highest posterior density interval (HPDI). Values in bold are those for which the 95% HPDI did not overlap 0.

| Comparison                | Hermaphrodite traits                         |   |  |   |        |   | Male trait |        |
|---------------------------|--|---|--|---|--------|---|------------|--------|
|                           | Total fertility                              | Early fertility                                 | Late fertility                               | Growth  | Growth | Growth  | Male trait | Growth |
| At 25°C                   |  |   |  |   |        |   |            |        |
| Control-Uranium           | <b>0.296</b> [ <b>0.150</b> ; <b>0.433</b> ] | <b>0.392</b> [ <b>0.201</b> ; <b>0.580</b> ]    | 0.096 [ -0.023 ; 0.174 ]                     | 0.026 [ -0.199 ; 0.235 ]                        |        | <b>-0.394</b> [ <b>-0.510</b> ; <b>-0.270</b> ] |            |        |
| Control-Salt              | <b>0.193</b> [ <b>0.097</b> ; <b>0.393</b> ] | 0.108 [ -0.109 ; 0.298 ]                        | <b>0.188</b> [ <b>0.080</b> ; <b>0.273</b> ] | -0.222 [ -0.451 ; 0.011 ]                       |        | for all prior environments                      |            |        |
| Control-Alternating       | <b>0.231</b> [ <b>0.077</b> ; <b>0.365</b> ] | <b>0.394</b> [ <b>0.171</b> ; <b>0.562</b> ]    | 0.042 [ -0.056 ; 0.140 ]                     | -0.007 [ -0.263 ; 0.178 ]                       |        |   |            |        |
| Uranium-Salt              | -0.033 [ -0.169 ; 0.124 ]                    | <b>-0.290</b> [ <b>-0.475</b> ; <b>-0.091</b> ] | 0.083 [ -0.018 ; 0.187 ]                     | -0.240 [ -0.460 ; 0.001 ]                       |        |   |            |        |
| Uranium-Alternating       | -0.011 [ -0.216 ; 0.069 ]                    | -0.064 [ -0.245 ; 0.148 ]                       | -0.059 [ -0.150 ; 0.060 ]                    | -0.075 [ -0.297 ; 0.151 ]                       |        |   |            |        |
| Salt-Alternating          | -0.043 [ -0.176 ; 0.109 ]                    | <b>0.315</b> [ <b>0.040</b> ; <b>0.456</b> ]    | -0.129 [ -0.249 ; -0.043 ]                   | 0.190 [ -0.045 ; 0.417 ]                        |        |   |            |        |
| Slope between 25 and 20°C | <b>0.742</b> [ <b>0.633</b> ; <b>0.837</b> ] | <b>-0.645</b> [ <b>-0.781</b> ; <b>-0.505</b> ] | <b>0.927</b> [ <b>0.853</b> ; <b>0.999</b> ] | <b>-0.479</b> [ <b>-0.644</b> ; <b>-0.339</b> ] |        | <b>0.286</b> [ <b>0.130</b> ; <b>0.436</b> ]    |            |        |

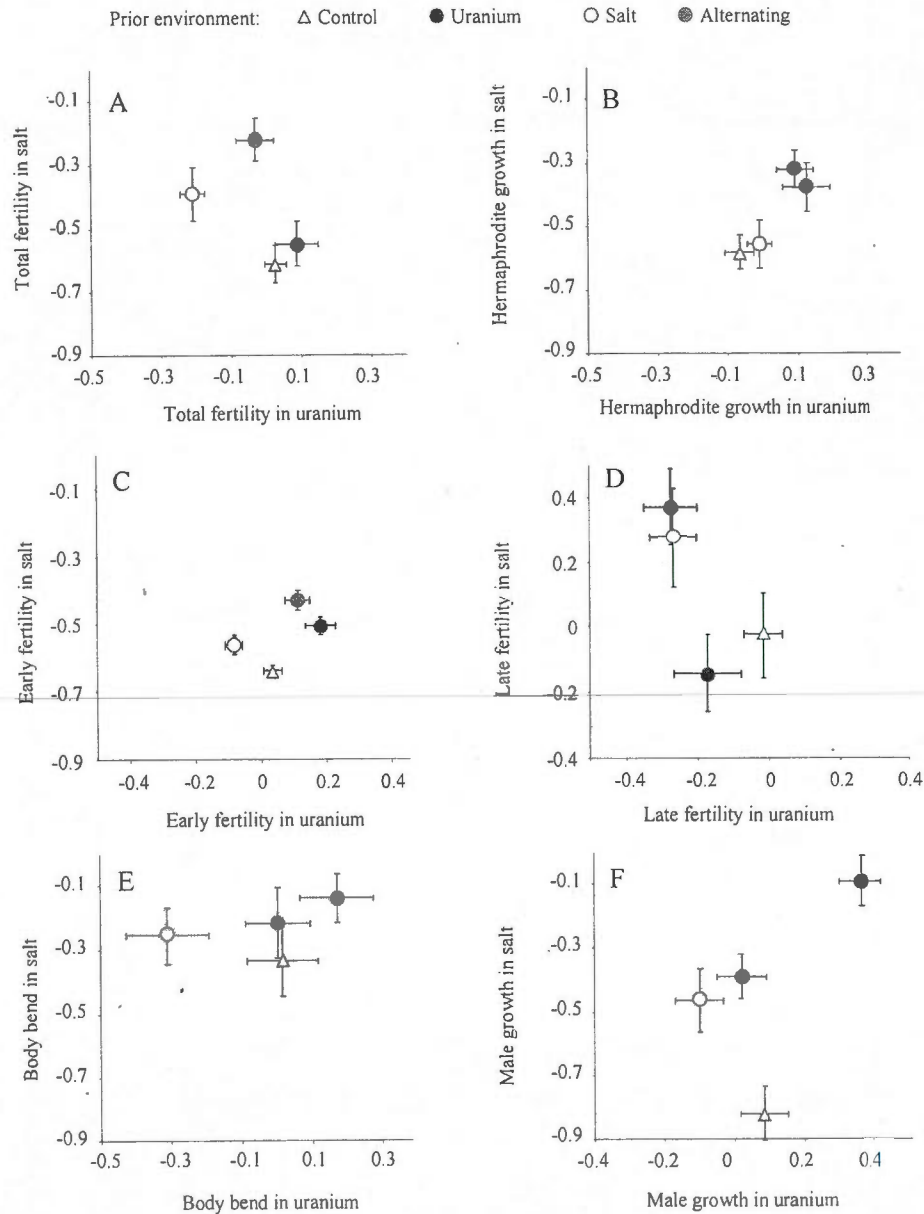


Figure 23. Average traits values in the reciprocal-transplant experiment.

Average values and their standard errors ( $n = 18$  individuals) for populations that have evolved in the four different treatments (i.e. control, uranium, NaCl and alternating uranium and NaCl) and then been put in the uranium (x axis) or NaCl (y axis) treatment during the reciprocal-transplant experiment at generation 18 of the multi-generation experiment. Traits (rescaled) were measured after individuals have spent three generations in the novel environment. Traits: total fertility (A); hermaphrodite growth (B); early fertility (C); late fertility (D); male body bend (E); male growth (F). Prior environment: control = empty triangle; uranium = filled black dots; salt = empty dots; alternating U/NaCl treatment = filled grey dots.

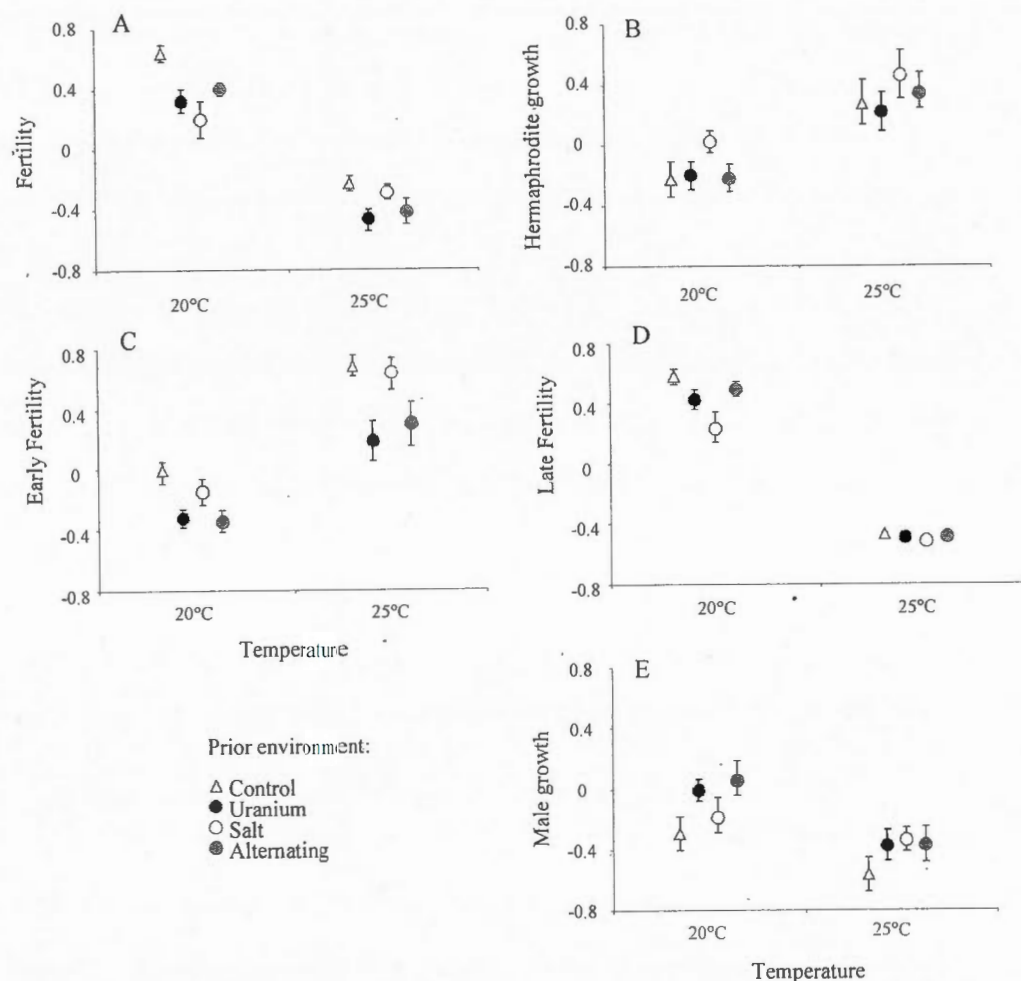


Figure 24. Common-garden experiment comparing populations that have evolved within different environments for 23 generations and put in a control environment at two different temperature treatments (20 and 25°C).

Traits (rescaled) were measured after individuals have spent three generations in the novel environment. Traits measured: total fertility (A); hermaphrodite growth (B); early fertility (C); late fertility (D); male growth (E). Symbols represent the mean and its associated standard error for 18 randomly sampled individuals in each treatment. Prior environment: control = empty triangle; uranium = filled black dots; salt = empty dots; alternating U/NaCl treatment = filled grey dots.

#### 4. Discussion

We found that the populations in the three different polluted environments had rapidly started to adapt to their stressful environment since their fitness increased between the fourth generation and the end of the multigenerational experiment, although they never reached the fitness level of control populations. The absence of temporal changes in the control environment, during the multigenerational or the successive common-garden experiments, indicates an absence of changes in the traits caused by uncontrolled, environmental, genetic drift, or selection effects during the experiments. Consequently it allows us to interpret any change observed in the treatment populations as genetic differentiation in response to selection pressures entailed by the pollutants. However, adaptation to the pollutants entailed a cost on fitness once populations were transferred into another stressful environment (reciprocal-transplant and common-garden at two different temperatures experiments) or back in the original environment (common-garden experiments). After having adapted to the alternating environment, populations showed higher fertility in both stressful environments (i.e. uranium and salt) and did not seem to show any supplementary cost in other environments, compared to populations adapted uniquely to uranium or salt.

Working on phenotypic measures, we may not be able set apart completely the epigenetic from the genetic basis of the phenotypic changes observed throughout the experiment. For example plants and rats exposed to some stressors can transmit epigenetic modification to unexposed progeny, down to the fourth generation (Anway *et al.*, 2005 ; Molinier *et al.*, 2006 ; Vandegehuchte & Janssen, 2011). However, in both the common-garden and the reciprocal transplant experiments we sought to overcome maternal effects by measuring traits only after the fourth generation. This precaution guaranteed us to eliminate all the changes observed across generation that could be caused by phenotypic



plasticity, maternal effects, grand-maternal effects, and probably also epigenetic effects. However, populations transferred back to their original conditions may experience their previous selection pressures. Then the rapid evolution of *C. elegans* in our experiments suggests that some genetic differentiation could have been induced by selection during that first four generations. Indeed, the measures were realized at the fourth generation in these experiments, and in the common-garden experiment, genetic changes could have occurred backward as a result of reverse evolution (e.g. Teotónio *et al.*, 2012), i.e. a return to the phenotypes of “ancestral” individuals as in control populations. This is possible, particularly when adaptation to the novel environmental conditions is costly (Lenski, 1998 ; Morgan *et al.*, 2007). In the reciprocal-transplant experiment we expect that novel selection pressures will drive the population towards novel phenotypic values in as fast as four generations. Such a reverse evolution in the common-garden experiment and novel evolutionary direction in the reciprocal-transplant experiments may have the disadvantage of reducing our ability to detect genetic differentiation between the populations that had evolved in different prior environments. Exposing *Daphnia magna* to organic pollutants (an insecticide and naphthalene) during twelve generations, Brausch & Smith(2009) have demonstrated that in only four generations populations were able to develop resistance to each of these pollutants. Then, after being put back into an unpolluted environment, populations lost their resistance to pollutants at only a few generations. Nevertheless, we think that the disadvantage of reverse or novel evolution in our experiment is circumvented by the possibility to eliminate almost all the epigenetic effects on the changes observed.

Furthermore, our multi common-garden experiment approach clearly illustrates the danger of doing only one common-garden experiment at a stage where populations have not been completely differentiated yet. For example, we would have miss change in



fertility in salt, or changes in growth in uranium. To achieve several measures across generations of phenotypic traits permits to observe the implementation of genetic differentiation in a stressful environment and not only compare to the control population at one point, as is usually done. Furthermore, using the combination of results from common-garden and reciprocal-transplant experiments permits us to identify different adaptation costs depending on several prior and novel environments. Moreover reciprocal-transplant gave us supplementary information, if the specialization at each pollutant gave a lower performance in the other pollutant or a better one.

#### 4.1. Changes during the first four generations

Populations subjected to each of the three stressful environments showed a strong reduction in fitness during the first four generations, although the increase in fitness between generation 1 and 4 was found only in the uranium and in the alternating environment. This early difference between salt and other populations was likely caused by a better capacity of *C. elegans* to response to uranium by acclimation in the first few generations of exposition (see more details in article III), and this particular capacity may be related to within-individual or to cross-generation phenotypic plastic response to the novel environment (Scheiner, 1993 ; Mousseau & Fox, 1998 ; Räsänen & Kruuk, 2007). At this stage, it is not clear yet for what reason *C. elegans* shows this particular ability to responds to uranium but not to salt

#### 4.2. Responses to differential selection pressures

Evolution in the three polluted environments was made visible by the differences in the slopes of the trait values with generations in the successive common-garden experiments.

Such evolutionary (i.e. genetic differentiation) responses of populations subjected to uranium or salt confirms our predictions based on our estimation of both the intensity of selection during multigenerational experiment (article III) and the moderate but existing heritability found on the studied traits (article II). Furthermore, our results indicate that populations evolved towards different life history strategies in response to the different stressors.

*C. elegans* responded to salt by reducing its fertility, and by increasing its generation time and its survival (article III and here Figure 22). There was no effect of the prior salt environment on total fertility at the first common-garden but then fertility decreased regularly over time. Consequently the effects of salt could entail a selection of particular life history strategy: individuals with longer life cycle, lower fertility, and a higher survival. Indeed survival before reproduction (here at 48h of age) was affected by salt environment, a trait more essential for fitness than the production of a large number of embryos.

In contrast, survival did not seem to be affected by uranium (see article III and appendix L1 for graphical representation of survival). Moreover, populations subjected to uranium or to the alternating environment showed a strong reduction in fertility and growth at the first common-garden (see also discussion of article I) possibly caused by epigenetic effects, followed by an evolutionary increase in fertility (in particular early fertility) and growth between generation 4 and 22. It should also be noted that fertility and growth were correlated (at least phenotypically) as there was covariance between them, i.e. effects on one trait affected the other. Furthermore, individuals from populations adapted to uranium had faster growth in uranium and also in salt environment compared to prior control and salt populations in the reciprocal-transplant. In uranium we have selected

individuals that grew faster. Growing faster can have a selective advantage. For example, best fitted individuals in a polluted environment can detoxify their body, prevent the internalization of pollutant or to reduce the negative effects of the pollutants by being bigger can reduce their internal pollutant concentration (Sibly & Calow, 1989 ; Guedes *et al.*, 2006). However, this reallocation of energy will be done at the expense of other traits or of fitness in other environments (Hoffmann & Parsons, 1991 ; Reznick *et al.*, 2000). Consequently, we may have selected individuals with higher fertility, high growth rate, and faster generation time (and may be lower life span). In other words, uranium seems to be associated to rapid life cycle adapted to reduce the period of contact with the pollutant.

Body bend frequency was not affected in the different experiments except a reduction in uranium for prior salt populations compared to the other populations. We also showed a significant evolutionary response of body bend in the salt environment in the multigenerational experiment (article III). Nonetheless this reduction in body bend probably hardly affected the encounter rate between males and hermaphrodites as male frequency was kept similar for all populations (see appendix L1 for graphical representation of the ratio of males). In *C. elegans* the ratio of males depend on the encounter rate between males and hermaphrodites as Lopes *et al.* (2008) showed it and locomotion behaviour promotes encounter rate between males and hermaphrodites (Pannell, 2002 ; Barrière & Félix, 2005a). In uranium, the reduction of body bend frequency (article III) were more probably due to effect on neurons and muscle cells (e.g. Wang & Wang, 2008a, 2008b). The cells require to form correct connections and assemble signalling proteins into synapses but any disruption would affect the locomotion behaviours (Loria *et al.*, 2004). These kinds of effects are mostly due to environmental constraints, which entail the change; they are not selected.

#### 4.3. Costs of adaptation

Populations adapted to a stressful environment show a lower fertility than the control populations when placed in another stressful environment. Populations adapted to salt were more susceptible to uranium and populations adapted to each of the three stressful environments showed a lower fertility than the control populations when they lived at both original and the increased temperature.

Similar findings were observed in several studies on adaptation to pollutants, with populations adapted to a stressor showing a reduction in fitness compared to control population when confronted to another stressor such as higher temperature, parasites or other heavy metals (Xie & Klerks, 2003 ; Salice *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b). In our multigenerational experiment, mutation rates was most probably not sufficient to generate genetic diversity over 22 generations, and thus the major evolutionary force was probably selection on the standing genetic variation in this *C. elegans* population (Mackay *et al.*, 1994 ; Denver *et al.*, 2009). Consequently we can assume a reduction of genetic diversity for the populations that evolved in our polluted environments, as that was demonstrated in other studies with pollutants (Ward & Robinson, 2005 ; Athrey *et al.*, 2007 ; Nowak *et al.*, 2009).

Costs of adaptation to pollutants for population in their original environment were also previously found (Shirley & Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Mireji *et al.*, 2010). Indeed the specific strategies of individuals selected in a polluted environment may not be optimal in a favourable environment. For example, it can consist in a reduction of pollutant assimilation (Xie & Klerks, 2003), the improvement of pollutant excretion (Posthuma & Van Straalen, 1993 ; Lagauzère *et al.*, 2009), the sequestration of the



pollutant (e.g. metallothionein synthesis; Shirley & Sibly, 1999 ; Gillis *et al.*, 2002 ; Jiang *et al.*, 2009), or every other biochemical, physiological or cellular modification that can limit the impact of the pollutant on the organism. In the presence of a pollutant the selected genotypes with a better capacity to use one of these mechanisms may thus be at a disadvantage if the population encounters more favourable environment. If the induction of these mechanisms is not plastic, it may not be shut down in the non-polluted conditions (i.e. the "facultative response" of Calow & Sibly, 1990). Combined with the reduction of genetic diversity, we assume that this phenomenon happened for the populations adapted to each of our three stressful environments.

However, costs of adaptation were not systematic. In the reciprocal-transplant experiment populations adapted to the prior salt environment showed some signs of specialization. Their fertility was higher than that of the control populations in salt but was lower in the novel uranium environment. In contrast, uranium populations never showed a lower performance than the control population when transferred in the salt environment. It thus seems that costs of adaptation were asymmetric between uranium and salt adapted populations (i.e. one specialist paid a cost but not the other). Several studies on microorganisms of viruses have shown asymmetric costs of adaptation (Kassen, 2002 and references therein; Jasmin & Kassen, 2007). The causes of such asymmetry must correspond to different pleiotropic effects accompanying genetic differentiation depending on environmental conditions (Travisano & Lenski, 1996 ; Rose *et al.*, 2005 ; Jasmin & Kassen, 2007). We thus need to know the biochemical, physiological and genetic mechanisms responsive of adaptive costs to start building a global framework to predict the presence of costs.



#### 4.4. Changing environment and the evolution of generalism

It is recognized that fluctuating or changing environments promote generalist genotypes, and constant environments promote specialist genotypes (Reboud & Bell, 1997 ; Cooper & Lenski, 2000 ; Turner & Elena, 2000). Interestingly, when placed in both uranium and salt, populations adapted to the alternating U and NaCl environment showed a better overall fertility than the populations that have evolved in constant polluted environment (note that in each specific environment the fertility of the alternating populations was not yet higher than the one of the other populations). Then these alternating populations performed as well if not better than the control populations in the uranium or in the salt environment. Furthermore, confronted to an increase in temperature or in original environment, these alternating populations did not show lower performance than the other populations. Our results, thus confirm the possibility that alternating or changing environmental conditions generate generalists genotypes that could have an advantage when confronted to one of these stressors.

A similar result was found for populations of viruses adapted to a novel host (Turner & Elena, 2000). Populations confronted to an alternating regime between two hosts were as well adapted to each host as population adapted to only one of the two hosts. Moreover, fluctuating or changing environments have been shown to better promote the diversification of populations than environments that contain all the novel conditions simultaneously (Buckling *et al.*, 2000 ; Cooper & Lenski, 2010 ; Collins, 2011). In this study we cannot show any evidence for a strong cost of adaptation to such a changing environment. The existence of cost-free generalists has been found in long-term evolution of microorganisms (Buckling *et al.*, 2007). In the same way, Reed *et al.* (2003) have shown that *Drosophila melanogaster* populations adapted to two stressors alternating in time had enhanced fitness in a novel stressful environment, than populations adapted

to only one of the stressors. These results change the vision that adaptation to a variety of environment could decrease the adaptive potential of populations.

#### 4.5. Implications for natural populations in polluted environments

Understanding the mechanisms and consequences of evolution of populations that suffered pollution has recently become a major challenge in our need to improve Ecological Risk Assessment process (Medina *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007 ; Coutellec & Barata, 2011 ; Klerks *et al.*, 2011). Our results confirm the existence of trade-offs between the adaptation to a particular stressor and the capacity to cope with other future stressors or to compete with other genotypes in a favourable environment (Coustau *et al.*, 2000 ; Roff & Fairbairn, 2007). Moreover, we show that the costs can appear in only six generations with pollutants (see also Xie & Klerks, 2003 ; Salice *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b). The interaction of anthropogenic stressors with other selection pressures may have severe consequences on the risks of extinction of natural populations.

The significant slopes in the successive common-garden experiments have practical implications for conservation biology. Running only one common-garden experiment at any time during a potential evolutionary process should be interpreted with caution, as it generally did with natural populations. If we had limited our study to the fifth common garden, we would not have seen the differentiation for growth during evolution in uranium and the longer implementation of cost on fertility during evolution in salt.

Adaptation in a predictably changing environment may not restrict the adaptive potential of the population to novel stressors (Reed *et al.*, 2003 ; Frankham & Kingsolver, 2004).

Consequently, we assume that if the strength of selection pressures entailed by pollution is well beyond that of other environmental stressors or if all the selection pressures go in the same direction, the population will respond to the pollutant. However, if the pressures entailed by other environmental stressors are opposed to those of pollution, the population will not have the ability to respond to the pollutant (Bell & Collins, 2008).

## 5. Conclusion

The circumstantial presences of adaptive costs reported in our study have an important role on the susceptibility of *C. elegans* populations. Life history strategy of selected individuals and adaptive costs depend on the type of stressor that the population is confronted to. Moreover, the costs did not appear in the same time, thus a better evaluation of the evolutionary processes and of the adaptive costs involve performing several measures of phenotypic traits across time. The increase of benefits after adaptation to the alternating environment without increase of costs in novel environments was particularly surprising. Nevertheless, we cannot be sure that supplementary costs could exist in other stressful environments that we have not studied. Future experiments on adaptive costs should focus on the causes of costs to be able to predict more largely if natural populations are more susceptible to environmental changes after adaptation to polluted and heterogeneous environments.

## Acknowledgements

We are very grateful to H. Teotónio for providing us with his base population. We especially thank R. Beaudouin, M. Gauduchon, R. Gilbin, P. Peres-Neto, G. Stora, and

J. Verreault for discussion in the early stage of this project. This work was part of the Envirhom-Eco research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

## SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Dans le cadre de ce doctorat, nous avons appliqué plusieurs techniques de biologie évolutive (lignées isogéniques, évolution expérimentale, jardins communs et transplantations réciproques) pour mieux comprendre et quantifier les effets d'environnements pollués sur l'évolution de populations de *C. elegans*. Nous débutons ce chapitre par une synthèse des résultats obtenus -présentés dans chacun des articles -, et nous examinons plus particulièrement leurs cohérences. Par la suite, nous abordons les changements de stratégie d'histoire de vie pour les populations adaptées et leurs implications. Pour terminer, nous présentons, les avantages et les inconvénients des méthodes utilisées.

### 1. Cohérence des résultats

L'héritabilité de la fertilité était plus faible en présence d'uranium qu'en présence de sel (article II). De plus, les pressions de sélection semblaient plus importantes à la concentration en sel retenue par rapport à celle en uranium (article II et III). Ceci explique, au moins en partie, la réponse évolutive plus faible pour ce trait dans l'uranium que dans le sel (Tableau 15 et voir l'annexe M sur la relation entre la réponse évolutive et l'héritabilité). Cependant, les jardins communs successifs (article IV) ont montré une réduction de la valeur sélective pour les populations adaptées à l'uranium qui est survenue avant celle des populations adaptées au sel. Il est possible qu'en présence d'uranium les populations aient subi une sélection forte sur certains traits non mesurés, mais impliqués dans des compromis évolutifs avec la fertilité (Thomas *et al.*, 2010), par exemple des



traits physiologiques reliés à la résistance aux métaux lourds. Une autre explication serait la présence d'effets épigénétiques uniquement dans les milieux contaminés à l'uranium et qui persisteraient dans l'environnement contrôlé (voir la discussion de l'article IV). Même si nous avons tenté de nous affranchir des effets épigénétiques, en mesurant les traits à la quatrième génération dans les jardins communs, nous ne pouvons pas garantir qu'ils n'ont pas eu un impact dans nos expériences. Ainsi, il est clair que désormais les effets épigénétiques doivent être pris en compte dans les études d'écotoxicologie évolutive pour les différencier des effets adaptatifs (Coutellec & Barata, 2011 ; Head *et al.*, 2012). Toutefois, même si dans nos expériences, nous n'avons pas pu discriminer les effets épigénétiques des effets adaptatifs, les coûts sur la fertilité sont bien présents même après quatre générations en absence de tout polluant.

Tableau 15. Synthèse des résultats : articles II, III et IV.

| Traits                   | Article II                              | Article III                                  | Article IV  |
|--------------------------|---|--|---|
| Fertilité                | $h^2$ et $S$ :<br>sel > uranium         | $R$ :<br>sel > uranium                       | Apparition coût :<br>uranium avant sel                  |
| Fertilité                | -                                       | $R$ :<br>alternance > constant               | Adaptation :<br>alternance > constant                   |
| Fertilité                | Pas de compromis :<br>sel/uranium       | -  | Coût :<br>sel dans uranium                              |
| Fertilité                | Compromis positif :<br>contrôle/uranium | -  | Coût :<br>uranium dans contrôle                         |
| Croissance               | Compromis négatif :<br>sel/uranium      | $R$ significative :<br>uranium et alternance | Croissance augmente dans sel :<br>uranium et alternance |
| Fertilité-<br>Croissance | Structure altérée : uranium             | Structure moins stable :<br>uranium          | -   |

Les zones grisées d'une même ligne signifient que les résultats sont cohérents. Les termes sel, uranium et alternance correspondent à l'environnement dans lequel les populations ont évolué.  $R$  : réponse évolutive ;  $S$  : sélection ;  $h^2$  : héritabilité.

L'autre effet qui n'a pas été confirmé d'une expérience à l'autre est la présence (ou l'absence) de compromis évolutifs entre les environnements, que ce soit pour la fertilité ou pour la croissance (article II). En effet, des coûts ont été détectés pour la fertilité alors qu'entre les environnements, un compromis positif existait à la première génération (contrôle-uranium) et parfois aucun compromis (sel-uranium ; Tableau 15). À l'inverse, lorsque le compromis était négatif pour la croissance (entre sel et uranium), une croissance plus rapide a été mise en évidence dans l'environnement salé, pour les populations adaptées à l'uranium (article IV). Cette incohérence pourrait s'expliquer par le fait que les compromis entre les environnements, pour un trait donné, peuvent être présents (ou absents) à la première génération, sans être persistants (ou en s'exprimant) dans les générations suivantes. Nous avons montré des altérations de l'expression de la structure génétique des traits, principalement dans l'uranium (article II et III). Ces altérations révélées à la première génération (article II) se sont confirmées durant l'expérience multigénérationnelle (article III). La matrice génétique semble avoir perdu de sa stabilité au cours du temps pour les populations ayant évoluées dans l'uranium. Or, cet effet a pu affecter les réponses évolutives des traits et influencer les compromis évolutifs entre le milieu contaminé par le l'uranium et l'environnement salé ou contrôle. D'autres résultats très intéressants concernent ceux obtenus à la suite de l'exposition des populations de *C. elegans*, pendant plusieurs générations, à un environnement d'alternance. En effet, les résultats sont contraires aux prédictions mais sont cohérents entre eux à travers toutes les expériences réalisées (articles II, III et IV). Nous nous attendions à une réponse évolutive plus lente pour tous les traits d'histoire de vie et une spécialisation moins forte pour chacun des deux polluants (Gram & Sork, 2001 ; Roff, 2002b), mais l'inverse s'est produit. Nous supposons que ceci est dû aux pressions de sélection induites par les deux polluants. Elles sont différentes (augmentation de la ponte précoce dans le sel et de la ponte tardive dans l'uranium) mais la tendance directionnelle

est la même. Il y a donc un effet de coévolution positive sur la fertilité, comme nous en avons déjà discuté (article III et IV).

## 2. Changements de stratégie d'histoire de vie

Dans l'uranium, la stratégie sélectionnée, par rapport à l'environnement contrôle, implique une fertilité élevée, une croissance plus rapide et un temps de génération plus court (article III et IV). Ce type de cycle de vie rapide peut permettre de réduire la durée de contact avec l'uranium, donc ces effets. En contrepartie, les individus sélectionnés ont probablement une durée de vie plus courte (c'est-à-dire un modèle évolutif  $r$  ; MacArthur & Wilson, 1967 ; Roff, 2002b). Cette stratégie permet également aux individus de mieux faire face à d'autres pollutions, comme celle entraînée par le milieu très salé (article IV). Toutefois, dans nos expériences, la nourriture était *ad libitum*. Or, cette allocation accrue d'énergie dans un développement rapide ne serait pas possible dans le cas d'une restriction alimentaire. En effet, cette stratégie demande d'acquérir beaucoup d'énergie en peu de temps. Ainsi il serait maintenant pertinent d'analyser les potentiels coûts adaptatifs de ces individus adaptés à l'uranium lorsque la nourriture est limitée en quantité.

Contrairement à l'uranium où la survie n'était pas affectée, le sel a entraîné la sélection d'individus avec un temps de génération plus long, une fertilité réduite, mais une meilleure survie avant la maturité sexuelle (article III et IV). Ce type de stratégie d'histoire de vie est cependant coûteux dans un environnement contrôle, sans polluant, puisque trop d'énergie est utilisée pour la maintenance somatique des individus et non pour leur reproduction. Il est également à noter que les mâles adaptés au sel et placés

dans un nouvel environnement pollué en uranium, ont vu leur vitesse de déplacement affectée et leur croissance diminuée. Si les mâles ont des difficultés pour se déplacer, alors cela pourrait avoir des répercussions sur leur capacité à rechercher de la nourriture et à s'accoupler avec des hermaphrodites. Toutefois, ne l'oublions pas, dans nos expériences, la nourriture était *ad libitum* et l'environnement (boîte de Petri) pouvait être entièrement parcouru par un individu en quelques minutes. Les mâles n'ont donc eu aucun problème pour trouver des partenaires et pour se nourrir. Ils peuvent ainsi choisir une stratégie moins coûteuse en énergie, passant par une réduction de l'activité locomotrice. Néanmoins, les populations naturelles pourraient ne pas avoir d'autre choix que d'adopter une stratégie différente. C'est par exemple le cas chez la drosophile, où les individus sauvages deviennent très actifs quand ils sont privés de nourriture, contrairement aux individus maintenus au laboratoire (Williams *et al.*, 2004).

Ainsi, par rapport aux populations contrôles, les stratégies évolutives ont été altérées chez les populations qui ont évolué en présence de sel ou d'uranium, et très différemment pour chacun des deux polluants. Il reste néanmoins à vérifier si dans la nature, contenant des contraintes environnementales supplémentaires par rapport à nos expériences de laboratoire, ces stratégies seraient également adoptées lors d'une pollution.

### 3. Avantages et inconvénients

La méthode des lignées isogéniques nous a permis d'identifier la structure génétique dans les différents environnements en seulement une génération (Tableau 16). A l'inverse, dans l'expérience multigénérationnelle, les jardins communs et les transplantations réciproques ont été réalisées sur la structure phénotypique, même s'il est également



possible de retirer de ces expériences des informations sur la génétique. Par ailleurs, ces dernières expériences étaient plus longues car elles nécessitaient de travailler sur plusieurs générations ; le temps de mesurer une réponse évolutive significative. Cependant contrairement à la méthode des lignées isogéniques, ces expériences nous ont permis d'obtenir une information robuste au cours du temps (voir plus haut la section « Cohérence des résultats »). Ensuite, la méthode des lignées isogéniques nécessite de travailler sur un très grand nombre d'individus, et autant que possible simultanément, pour acquérir une information robuste, avec des intervalles de crédibilité réduits. Néanmoins, réaliser de nouveau ce type d'expérience (c'est-à-dire sur une génération) sur les individus des populations qui ont évolué dans les environnements pollués, pendant 22 générations, aurait également permis de valider ou non les effets sur la matrice *G*.

Tableau 16. Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées.

Article : II (lignées isogéniques), III (évolution expérimentale) et IV (jardins communs et transplantations réciproques).

|                      | Article II   | Article III   | Article IV   |
|----------------------|--|---|--|
| <b>Avantages</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Expérience rapide</li> <li>● Structure génétique</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Information continue</li> <li>● Vitesse et cible de la réponse évolutive</li> </ul>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Information continue</li> <li>● Identification des coûts sur la valeur sélective</li> </ul> |
| <b>Inconvénients</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Manque de puissance statistique</li> <li>● Changement au cours du temps non visible</li> <li>● Incertitude des coûts</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Expérience longue</li> <li>● Structure phénotypique</li> <li>● Coûts inconnus</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Expérience longue</li> <li>● Structure phénotypique</li> </ul>                              |

Au cours des expériences de jardins communs et de transplantations réciproques, nous avons cherché à nous affranchir des effets maternels et épigénétiques en effectuant les mesures seulement à partir de la quatrième génération. Cependant, la rapidité d'évolution de *C. elegans* dans nos expériences laissent penser que nous avons pu aussi induire de nouveau de la différenciation génétique dans ces expériences. En effet, les



mesures étant réalisées à la quatrième génération, des modifications génétiques pourraient à nouveau se produire par une évolution inversée (= reverse evolution en anglais ; voir discussion de l'article IV).

Les microévolutions observées dans nos expériences sont principalement dues à de la sélection sur la variation génétique préexistante dans la population, puisqu'elles sont survenues très rapidement : en une dizaine de générations (Mackay *et al.*, 1994 ; Denver *et al.*, 2009). Les implications de ce type d'évolution, par rapport à une évolution due essentiellement à des mutations bénéfiques, sont différentes. Une sélection forte entraîne une réduction rapide de la diversité génétique. En effet, certains allèles, déjà inclus dans la variation génétique préexistante (neutre en environnement favorable), sont bénéfiques dans le nouvel environnement. A l'inverse, cette fixation d'allèles sera plus longue s'ils sont apportés par mutation (faible nombre de copies à l'apparition) puisqu'ils nécessitent de se propager dans la population (Hermisson & Pennings, 2005 ; Barrett & Schluter, 2008). Le changement de diversité génétique n'est donc pas aussi important et rapide. Ainsi, l'effet de prédominance de la sélection entraîne une forte probabilité d'apparition de coûts adaptatifs du fait de la réduction de diversité génétique. En outre cette réduction de diversité génétique diminue la probabilité de retour à l'état initial (évolution inversée) lors d'un nouveau transfert en environnement favorable. En effet, certains allèles perdus ne seront pas nécessairement retrouvés, sans flux de gènes (Kawecki *et al.*, 2012) ou sans une période suffisamment longue qui permettent la fixation de mutations bénéfiques (Lenski, 1998). Notons que même avec un taux de mutation important – qui est un processus aléatoire – un retour vers la même stratégie d'histoire de vie qu'avant l'adaptation au polluant reste incertain. En environnement naturel, malgré la sélection, certains mécanismes permettent la conservation de la variation préexistante. Nous pouvons citer le flux de gènes ou l'hétérogénéité spatiale et temporelle qui peuvent

révéler de la variation génétique cryptique (Gibson & Dworkin, 2004). L'importance de la réduction de la diversité génétique doit donc être validée pour des populations naturelles vivant dans des milieux pollués (voir la section « perspectives »).

Même si des études sur les coûts adaptatifs existaient déjà, la répétition de leur mesure à travers le temps est rare (voir cependant Brausch & Smith, 2009). En effet, les études sont généralement réalisées pour un seul point de mesures lors d'une génération donnée (par exemple Shirley & Sibly, 1999 ; Ward & Robinson, 2005 ; Jansen *et al.*, 2011b). Or, nous avons réalisé dix points de mesures successives pour l'expérience multigénérationnelle (article III) et cinq points pour les jardins communs (article IV). Ceci nous a permis d'observer la mise en place de certains coûts (par exemple le coût sur la fertilité dans l'environnement salé). De plus, la comparaison entre différents types de stress environnementaux, comme nous l'avons réalisé, est peu fréquente (voir cependant Jasmin & Kassen, 2007 ; Jansen *et al.*, 2011a). Ainsi nous avons pu discuter de la complexité d'interprétation des coûts adaptatifs (voir l'article IV), notamment de leur détection (voire leur présence) qui n'est pas systématique (Coustau *et al.*, 2000 ; Reznick *et al.*, 2000 ; Lopes *et al.*, 2008). Désormais nous avons besoin de passer à une nouvelle étape scientifique qui permettra de mieux appréhender ces coûts (voir la section « perspectives »).

Dans cette étude, nous avons travaillé avec des concentrations élevées en uranium et en sel. Malgré tout, ces concentrations recouvrent une certaine réalité environnementale puisque dans des écosystèmes, il est tout à fait possible de mesurer de tels niveaux de contamination (article I). Les concentrations utilisées tout au long de nos expériences nous ont permis de mettre en évidence des processus évolutifs rapides et marqués. Il est clair que selon l'espèce et le milieu choisi, les processus évolutifs auraient été détectés à

d'autres concentrations en uranium et en sel. Pour mettre en évidence des phénomènes adaptatifs avec des concentrations plus faibles en uranium et en sel, nous aurions dû changer de modèle biologique. Or *C. elegans*, comme nous l'avons déjà mentionné, offre de nombreux avantages pour réaliser des études en biologie évolutive expérimentale (une petite taille, un cycle de vie court, etc.). A titre d'exemple, prenons un autre modèle biologique très utilisé en écotoxicologie : la daphnie, *D. magna*. Les traits d'histoire de vie de *D. magna* sont affectés à de très faibles concentrations en métaux lourds ou en pesticides (Ward & Robinson, 2005 ; Massarin *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2011b). En exposant *D. magna* à une concentration en uranium de 0,32  $\mu\text{M}$ , sa fertilité à la deuxième génération d'exposition est déjà quasi-inexistante (Massarin *et al.*, 2010). Dans notre étude, nous avons dû travailler à une concentration 3500 fois plus importante pour obtenir des effets moindres sur la fertilité (article III). Cette différence ne peut uniquement s'expliquer par les différences de conditions d'exposition, mais certainement par des différences de sensibilité inter-espèce. Cependant, le cycle de vie de *D. magna* étant plus long (21 jour en moyenne), est la taille plus importante, par rapport à *C. elegans*, il est nettement plus contraignant de réaliser des expériences de biologie évolutive expérimentale sur une vingtaine de générations. A l'inverse, si nous avions travaillé sur des microorganismes, nous aurions pu considérablement augmenter le nombre de générations, mais en parallèle, nous aurions dû probablement augmenter les concentrations en uranium et en sel pour observer des phénomènes adaptatifs. Par exemple, la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, peut survivre à des concentrations en NaCl supérieur à 2000 mM (Bell & Gonzalez, 2009), alors que dans notre étude nous avons mesuré une mortalité de 100 % à 769 mM NaCl. De plus, puisque nous nous intéressions à la sélection sur la variation génétique préexistante et non sur l'apport de nouvelle mutation bénéfique (voir plus haut) la vitesse du cycle de vie de *C. elegans* était appropriée. Il faut également ajouter que *C. elegans* nous permettait d'obtenir des informations sur un

métazoaire et non pas sur des microorganismes, les deux types de modèle biologique étant complémentaires.

Finalement, les effets sur les traits d'histoire de vie surviennent à des concentrations différentes en fonction de l'espèce, du polluant et du milieu, ce qui influence partiellement l'apparition de réponses microévolutives et de coûts adaptatifs. Chaque modèle biologique a ses avantages et ses inconvénients. Mais l'existence de ces effets évolutifs est une réalité et leur détermination et leur compréhension, dans un cadre globale d'évaluation du risque pour les écosystèmes est extrêmement importante (Coutellec & Barata, 2011).

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce chapitre est divisé en deux parties. Une première partie où nous abordons les principaux points à retenir concernant les coûts adaptatifs en lien avec des populations exposés à des stress environnementaux, et une deuxième partie où nous présentons les différentes perspectives envisageables à la suite de ce travail.

### 1. Conclusion

Nous avons démontré dans notre étude que malgré la complexité des effets microévolutifs lors d'une pollution, il était possible d'en dégager un patron global (Figure 25). Si les pressions de sélection sont faibles, la population peut y faire face uniquement par acclimatation. Cependant si ces pressions sont trop fortes, alors la population doit s'adapter pour espérer retourner vers une valeur sélective optimale dans son nouvel environnement. Notons que cet optimum ne conduit pas nécessairement à une fertilité maximale et à un temps de génération minimal dans le nouvel environnement. Par ailleurs, la réponse évolutive sera d'autant plus importante que les pressions seront fortes. Toutefois, ces réponses évolutives vont également dépendre du lien entre le trait étudié et la valeur sélective individuelle (Kruuk *et al.*, 2003). En effet, pour des traits moins étroitement reliés à la valeur sélective, et malgré leur héritabilité, les pressions de sélection peuvent avoir une action moins importante (par exemple l'activité locomotrice dans expériences).



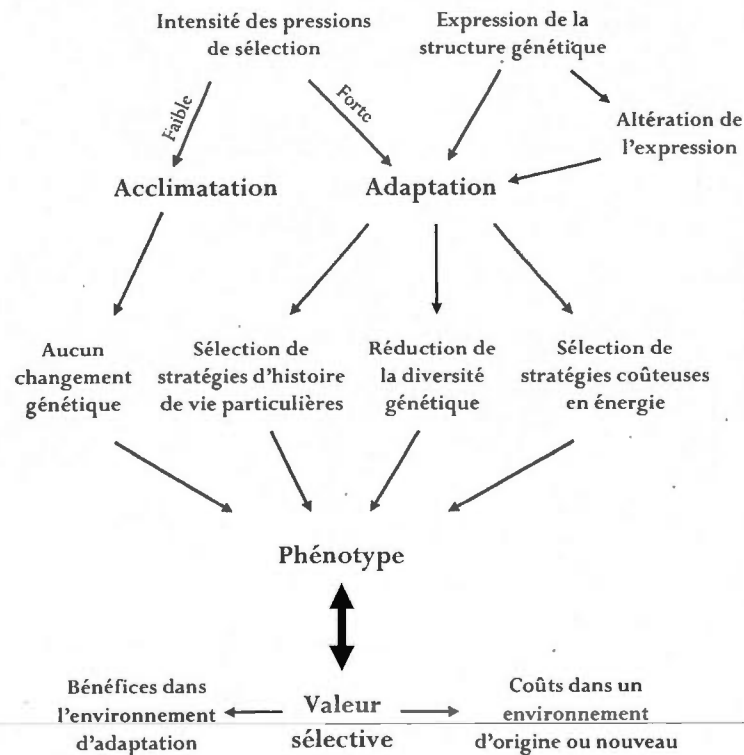


Figure 25. Evènements évolutifs lors d'un changement environnemental brusque qui dure pendant plusieurs générations et ses conséquences sur la valeur sélective dans cet environnement ou dans un autre environnement.

La flèche à double sens signifie qu'il existe une corrélation entre la valeur sélective et le trait, c'est-à-dire, son lien – direct ou indirect – avec la valeur sélective. Les autres flèches indiquent une causalité.

Les conséquences sur la structure génétique ont pu être mises en évidence, au moins en partie, à travers une expérience menée avec des lignées isogéniques et une étude multigénérationnelle de la structure phénotypique entre les traits (la croissance et la fertilité). Suite à ces deux travaux, nous avons démontré que dans l'uranium, comparé au sel, l'héritabilité était moins importante et l'expression de la structure génétique était moins stable. Ainsi, les réponses évolutives étaient plus faibles dans le milieu pollué par une concentration constante en uranium, en comparaison des autres environnements pollués.

Sans une étude approfondie des mécanismes génétiques de l'adaptation, nous ne pouvons pas connaître les causes exactes des coûts adaptatifs, mais plusieurs explications sont envisageables, en particulier concernant les coûts sur la fertilité. Tout d'abord, l'adaptation aux différents milieux pollués a certainement entraîné une réduction de la diversité génétique via l'élimination des génotypes non résistants, ce qui a affecté la valeur sélective des individus (Reed & Frankham, 2003). Cette érosion de la diversité génétique des populations engendre des coûts adaptatifs quand les populations sont soumises à de nouveaux environnements stressants. Face à ces nouveaux stress, les populations ne sont plus capables de s'acclimater ou de s'adapter à cause de la perte de génotypes au sein de la population initiale (Ward & Robinson, 2005 ; Athrey *et al.*, 2007). Ensuite, la sélection de génotypes résistants, reliée à la réduction de diversité génétique, est aussi une cause de coûts. En effet, la sélection de stratégies individuelles particulières confère un avantage sélectif dans le nouvel environnement stressant. Cependant, cette sélection peut aussi entraîner, en contrepartie, un éloignement de la valeur sélective optimale moyenne des individus, dans un environnement non pollué ou d'autres environnements stressants où les pressions de sélection sont très différentes (Kraaijeveld & Godfrey, 1997 ; Burdon & Thrall, 2003).

Les effets évolutifs dus à une pollution présente pendant plusieurs générations au sein de l'habitat d'une population, peuvent être très préjudiciables au maintien des populations. Dans notre étude, nous avons démontré que des coûts adaptatifs pouvaient apparaître en seulement six générations, ce qui est extrêmement rapide même pour des phénomènes microévolutifs. Pour une évaluation des risques écologiques rigoureuse et complète, il est donc indispensable de considérer les conséquences évolutives de la présence d'un polluant sur des populations dans l'environnement. Cependant, malgré ces coûts importants qui se mettent en place rapidement, nous n'avons pas mesuré de surcoût à

l'adaptation dans l'environnement d'alternance. Pourtant, l'évolution de ces populations a été plus rapide, avec une valeur sélective cumulée – dans les environnements pollués en uranium et au sel – plus importante. Ce dernier résultat laisse penser que les populations vivant dans des milieux naturels, qui sont en général beaucoup plus fluctuant (nourriture, température, pollution, parasites, etc.) que nos conditions expérimentales, pourraient peut-être subir des coûts évolutifs moins importants que dans nos expériences. Ceci reste néanmoins à valider à travers la réalisation de travaux de recherche dans des conditions environnementales naturelles (voir les perspectives ci-dessous).

## 2. Perspectives

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressés en particulier à un polluant bien précis : l'uranium. Comme nous l'avons déjà mentionné, ce métal lourd est radioactif mais, à l'opposé de nombreux autres radioéléments, sa chimiotoxicité est prépondérante par rapport à sa radiotoxicité. Se pose donc la question des conséquences évolutives des autres radioéléments sur les populations. Lors des catastrophes nucléaires de Tchernobyl et de Fukushima-Daiichi, de nombreux radionucléides se sont retrouvés disséminés dans l'environnement (UNSCEAR, 2000 ; Smith & Beresford, 2005 ; Kinoshita *et al.*, 2011 ; Yasunari *et al.*, 2011). Or, à cause de la nature de cette pollution particulière, le processus de sélection qui est prépondérant lors d'événements microévolutifs (Barrett & Schluter, 2008) est accompagné d'un taux de mutation extrêmement fort (Frankenberg-Schwager, 1989 ; Phillips & Morgan, 1993). Ceci entraîne des effets différents de ceux d'un processus de sélection, tels que démontrés par les travaux conduits au Japon par Hiyama *et al.* (2012), suite à l'accident de la centrale nucléaire de Fukushima-Daiichi. Dans cette étude, des populations de papillon, *Zizeeria maha*, vivent dans des zones polluées par des substances radioactives et subissent des dommages physiologiques et génétiques. Or, les

effets persistent et s'accroissent même après six générations. Malgré la sélection des individus les plus résistants, le taux de mutation étant tellement important et aléatoire qu'il peut sans cesse agir sur de nouveaux traits, et même sur la capacité à résister à ces mutations elles-mêmes (par exemple sur les mécanismes de réparation de l'ADN). Il est donc maintenant important de comparer les effets de la sélection et des mutations sur les réponses évolutives de populations (Barrett & Schluter, 2008), dans le cas particulier de l'induction de ces mécanismes évolutifs par des polluants. La diversité génétique au cours du temps pourrait ne pas être amoindrie face à l'irradiation mais seulement différente à cause d'une sélection inefficace par rapport à un taux de mutation extrêmement important.

Si nous revenons à notre modèle biologique, *C. elegans*, un autre point est à souligner. Ces populations sont généralement retrouvées dans l'environnement au stade dauer, c'est-à-dire un stade de développement plus résistant aux conditions environnementales (Barrière & Félix, 2005a). Il serait important de vérifier que les populations adaptées à une pollution conservent leur capacité de passage au stade dauer. En effet, un simple arrêt de la production d'une enzyme particulière peut par exemple empêcher cette formation de larve de résistance (Hanover *et al.*, 2005). Cela pourrait être testé en l'absence de nourriture (ou toutes autres contraintes induisant cette réponse plastique ; voir Golden & Riddle, 1984). Si le pourcentage d'individus capables de passer à ce stade de résistance diminue dans les populations adaptées à une pollution, cela pourrait avoir des conséquences graves pour les populations naturelles qui perdraient leur meilleur moyen de résistance face à certaines contraintes naturelles dans l'environnement (voir la partie « 2.2.3. Forme de résistance » du chapitre « Etat des connaissances »).

L'utilisation de différents polluants nous a permis de comparer des phénomènes différents, notamment les changements de structure génétique. Cependant, nous aurions pu également faire le choix de travailler sur une gamme de concentration. Ce qui nous aurait permis de comparer les réponses des pressions de sélection fortes et faibles (initié dans l'article I), pour mieux définir les effets de ces pressions sur la vitesse d'adaptation et la capacité à s'acclimater.

Un cadre global a besoin également d'être défini pour étudier les coûts adaptatifs. On retrouve pour le moment plusieurs études qui permettent d'évaluer la présence et l'importance des coûts, ce que nous avons d'ailleurs effectué ici. Désormais, il devient nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents afin d'identifier pourquoi ces coûts n'existent pas dans certains nouveaux environnements ou pour certains traits. Nous avons décidé de travailler sur des réponses phénotypiques et même s'ils apportent des preuves et des réponses sur ces coûts adaptatifs, un travail est maintenant nécessaire sur les effets génétiques afin de comprendre comment les effets apparaissent. La génomique permettant de déterminer des génomes entiers ou des cartographies génétiques à petites échelles aurait pu être d'un grand soutien pour cela. En effet, grâce à des projets de recherche à l'interface entre la génomique et l'évolution expérimentale, il a déjà été possible de découvrir des gènes d'intérêts même pour des traits polygéniques comme la taille des individus (par exemple chez la drosophile : Turner *et al.*, 2011). Il a aussi été possible de comprendre comment les interactions épistatiques et les mutations bénéfiques affectent le potentiel évolutif des populations ou l'origine de nouvelles fonctions (Chou *et al.*, 2011 ; Khan *et al.*, 2011).

Ensuite, en revenant à une approche phénotypique, il serait possible de comparer l'effet sur des populations de différents polluants connus pour agir sur les mêmes mécanismes



physiologiques ou sur des mécanismes opposés. Ceci est possible grâce aux nombreuses connaissances que nous apporte l'écotoxicologie sur les mécanismes biochimiques, physiologiques et génétiques à l'origine de la résistance aux polluants. Aschner & Martinez-Finley (2011) ont par exemple répertorié chez *C. elegans* les connaissances sur les mécanismes de détoxification mis en place en présence de très nombreux métaux. Grâce à une telle approche, nous pourrions comparer la réponse évolutive de populations à différents polluants et identifier la résistance face à une nouvelle pollution dans un cadre plus précis. En effet, il se pourrait que les populations adaptées accèdent à la même résistance lorsque que la nouvelle pollution implique les mêmes mécanismes de détoxification et à l'inverse que les coûts adaptatifs soient d'autant plus importants pour elles si la nouvelle pollution implique des mécanismes totalement différents.

Nous avons déjà présenté plusieurs perspectives dans les discussions de nos différents articles. En particulier, nous avons mis en avant que nos travaux pouvaient représenter une contribution au développement des connaissances dans le domaine de l'évaluation des risques écologiques, associées à la contamination de l'environnement par des polluants (article IV). Dans des conditions naturelles, les variations environnementales influencent la valeur sélective des individus et la démographie de la population, en modifiant les pressions de sélection (Eränen, 2008). Ainsi les populations ont une probabilité plus faible de s'adapter à cause de l'hétérogénéité temporelle et spatiale. Néanmoins, cela dépendra de l'intensité des pressions de sélection provoquées par la concentration du polluant. Par exemple, si les pressions de sélection qu'il entraîne sont bien au-delà de celles des autres stress environnementaux, alors les populations y répondront par la sélection naturelle. Il est d'ailleurs possible que plusieurs stress, comme nous l'avons vu à travers l'étude de l'environnement d'alternance (uranium-sel), entraînent des pressions de sélection dont la tendance directionnelle est la même,

permettant ainsi à la population de s'adapter à plusieurs stress. Cependant, si dans un même environnement des pressions de sélection directionnelles s'opposent à celles entraînées par la pollution, alors la population n'aura pas la capacité de s'y adapter (Bell & Collins, 2008). Par ailleurs, il faudrait également mesurer l'héritabilité des traits d'histoire de vie chez des populations naturelles, dans des environnements similaires mais où l'on retrouve une pollution ou non. Cela permettrait de quantifier les effets de la pollution sur le potentiel évolutif des populations naturelles, comme c'est déjà le cas pour d'autres stress environnementaux (voir Charmantier & Garant, 2005). De plus, nous savons déjà que ces coûts adaptatifs existent dans la nature. Un changement évolutif rapide – dans les 50 à 100 dernières années – s'est produit pour des populations d'une espèce de poisson d'atlantique, *Microgadus tomcod*, à cause de la présence de polychlorobiphényles (PCBs) dans leur habitat (Wirgin *et al.*, 2011). Cette augmentation de la résistance serait aussi à relier à une sensibilité accrue aux faibles niveaux d'oxygène et aux changements de température de l'eau. Il est donc nécessaire de réaliser des études de terrain sur des sites pollués pour les comparer à des études en laboratoire avec les mêmes polluants, afin de quantifier à quel point l'hétérogénéité environnementale peut affecter la réponse évolutive.

## COMMUNICATIONS ET FORMATIONS

### Articles en lien avec cette thèse

- Dutilleul M., Lemaire L., Réale D., Lecomte C., Galas S., Bonzom J.-M. Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology*. Submitted.
- Dutilleul M., Goussen B., Bonzom J.-M., Galas S., Réale D. Pollution breaks down the expression of genetic structure of life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Evolutionary Biology*. Submitted.
- Dutilleul M., Bonzom J.-M., Lecomte C., Goussen B., Galas S., Réale D. Multivariate analyses of evolutionary changes in life history traits of a *Caenorhabditis elegans* population exposed to pollution. *Evolution*. In prep.
- Dutilleul M., Réale D., Goussen B., Lecomte C., Daian F., Galas S., Bonzom J.-M. Benefits and costs of adaptation to constant and alternating polluted environments. Evolutionary applications. In prep.

### Autres articles (co-auteur)

- Pereira S., Bourrachot S., Cavalie I., Plaire D., Dutilleul M., Gilbin R., Adam-Guillermine C. (2011) Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30 (12): 2831-2837.
- Goussen B., Parisot F., Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Péry A.R.R., Bonzom J.-M. Consequences on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity of multi-generation exposure to uranium. *Ecotoxicology*. Submitted.

## Communications orales dans un congrès national ou international

- Dutilleul M., Réale D., Lecomte-Pradines C., Goussen B., Galas S., Bonzom J.-M. S'adapter, mais à quel coût ? Une étude expérimentale chez *C. elegans*. Petit Pois Dérivé 2011, 33<sup>ème</sup> réunion annuelle du Groupe d'Etude de Biologie et Génétique des Populations, Août 2011, Toulouse, France.
- Dutilleul M., Réale D., Goussen B., Galas S., Bonzom J.-M. Rapid evolution in a *C. elegans* (nematodes) population: evaluation of resistance costs. 6th SETAC World Congress, Mai 2012, Berlin, Allemagne.
- Goussen B., Parisot F., Péry A.R.R., Beaudouin R., Buisset-Goussen A., Dutilleul M., Lecomte C., Bonzom J.-M. Evaluation des effets de la pollution sur la dynamique de population de *C. elegans* à travers une approche bioénergétique : approche expérimentale. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Juillet 2012, Lyon, France.
- Dutilleul M., Bonzom J.-M., Goussen B., Galas S., Réale D. Evolutionary changes in life history traits in a *C. elegans* population exposed to pollutants. 1st joint Congress on Evolutionary Biology, Juillet 2012, Ottawa, Canada.
- Dutilleul M., Réale D., Galas S., Bonzom J.-M. Réponses microévolutives et coûts adaptatifs d'une population de *C. elegans* exposée à diverses pollutions. Journées des thèses de l'IRSN. Octobre 2012, Le Croisic, France.

## Récompense :

- 2<sup>ème</sup> prix du jury (montant de 500\$) lors de la finale du concours « Votre soutenance en 180 secondes » réunissant 16 universités ou institut de recherche du Québec. 80<sup>ème</sup> congrès de l'Association francophone pour le savoir (Acfas), le 7 mai 2012.

## Communications par affiche dans un congrès national ou international

- Dutilleul M., Galas S., Lecomte-Pradines C., Descamps S., Gauduchon M., Réale D., Bonzom J.-M. Toxicité chronique de l'uranium chez *Caenorhabditis elegans*, expression des traits d'histoire de vie et réponses aux contraintes environnementales. Modèles en Ecologie Evolutive, Mai 2010, Montpellier, France.

- Dutilleul M., Galas S., Lecomte-Pradines C., Descamps S., Gauduchon M., Réale D., Bonzom J.-M. Expression of life-history traits to environmental constraints of *C. elegans* population affected by chronic toxicity of uranium. Evolutionary Biology of Caenorhabditis and Other Nematodes, Juin 2010, Cambridge, UK.
- Dutilleul M., Lemaire L., Galas S., Descamps S., Lecomte-Pradines C., Gauduchon M., Réale D., Bonzom J.-M. Effets de l'uranium sur l'évolution des traits d'histoire de vie d'une population de *C. elegans*. Ecologie 2010, Septembre 2010, Montpellier, France.
- Dutilleul M., Lemaire L., Galas S., Descamps S., Lecomte-Pradines C., Gauduchon M., Réale D., Bonzom J.-M. Effets de l'uranium sur l'évolution des traits d'histoire de vie d'une population de *C. elegans*. Journées des thèses de l'IRSN. Septembre 2010, Arles, France.
- Goussen B., Parisot F., Péry A.R.R., Beaudouin R., Buisset-Goussen A., Dutilleul M., Lecomte C., Bonzom J.-M. Evaluating effects of pollution on *Caenorhabditis elegans* population dynamic through a bio-energetic approach. 6th SETAC World Congress, Mai 2012, Berlin, Allemagne.

#### Formations en France

- Encadrement du stage de master 1 de 15 semaines du 17/05/10 au 27/08/10 de Laurie Lemaire. Je l'ai notamment formé à l'expérimentation sur *C. elegans* pour que nous puissions réaliser ensemble l'expérience de l'article I.
- Formation Initiale à la Radioprotection et Hygiène, Sécurité, Environnement – IRSN/Cadarache – 23 heures.
- Biostatistiques : Techniques Bootstrap – IRSN/Cadarache – 14 heures.
- Séminaire : Modèles en Ecologie Evolutive – Montpellier – 7 heures.
- Conduite d'autoclaves – IRSN/Cadarache – 6 heures.



### Formations au Québec

- Projet de thèse – UQAM – 1 mois à temps plein sur la préparation de mon projet de doctorat – Rapport et soutenance de 40 min devant un jury.
- Introduction à la gestion des ressources humaines dans le secteur des sciences biologiques – UQAM – 15 heures de cours avec examen sur la participation.
- Initiation à l'enseignement au postsecondaire – UQAM – 15 heures de cours avec rapport et examen oral devant l'enseignant.
- Examen de synthèse – UQAM – 1 mois à temps plein de travail sur l'article suivant : Wund M.A. *et al.* (2008) A test of the "flexible stem" model of evolution: Ancestral plasticity, genetic accommodation, and morphological divergence in the threespine stickleback radiation. *American Naturalist*. 172 (4):449-462 – Rapport et soutenance de 40 min devant un jury.
- Séminaire – UQAM – Soutenance de 45 min sur les résultats de mon doctorat devant un public.

## APPENDICES

### Appendix A – Comparison of N2 and Teotónio populations

#### Introduction and method

Population of N2 was firstly chosen for our experiments. However, this population is not a genetically diverse population and the presence of males is extremely low. Consequently, we changed for the base population of Teotónio. Since we had the data for the two populations we wanted to shortly compare their life history traits in control and uranium environments: data for traits in the N2 population come from article I; data for fertility, survival and body bend frequency in the Teotónio population come from article III, and growth from article II.

#### Results and discussion

The fertility of N2 in the control environment was on average 34% more than for Teotónio population (Table A1). Besides, fertility of Teotónio population was reduced compared to most *C. elegans* populations (Hodgkin & Barnes, 1991). This could be explained by the likely outbreeding depression caused by the hybridization between the diverse wild isolates (Dolgin *et al.*, 2007), to create the population used in our experiments (Teotónio *et al.*, 2012). Furthermore, sperm production by hermaphrodites seems less important in the Teotónio population since the male rate is high (Hodgkin & Barnes, 1991). Indeed, to obtain a measure of fertility, we simply allowed

hermaphrodites of Teotónio population to reproduce by self-fertilization. However since there are a large number of male, hermaphrodites do not need to produce a large number of sperm in order to fecund all their oocytes. Growth was slightly higher for N2 population but the standards deviations for both populations overlapped. Body bend frequency was higher in Teotónio population. However, contrarily to the N2 population, it was measured on males, and males need to be faster to encounter a maximum of hermaphrodites and thus transmit their genes (Pannell, 2002 ; Barrière & Félix, 2005a).

Table A1. Average trait values and standard deviations for N2 and Teotónio populations in the control at the first generation and in the uranium environment during the 3 first generations. Fertility is measured by the number of larvae produced by a hermaphrodite. Growth is measured as the increase in total length (in  $\mu\text{m}$ ) between 0 to 72h. Body bend is a frequency of movement during 20s and survival is in percent.

| Environment | Generation | Brood size       |                  | Growth at 72      |                   | Body bend      |                | Survival       |                |
|-------------|------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|             |            | N2               | Teotónio         | N2                | Teotónio          | N2             | Teotónio       | N2             | Teotónio       |
| Control     | P0         | 248.4 $\pm$ 24.9 | 185.1 $\pm$ 24.7 | 1020.0 $\pm$ 84.1 | 953.0 $\pm$ 131.0 | 15.2 $\pm$ 1.6 | 17.5 $\pm$ 1.7 | 90.5 $\pm$ 8.2 | 99.2 $\pm$ 0.5 |
|             | P0         | 144.8 $\pm$ 15.9 | 75.2 $\pm$ 40.4  | 845.1 $\pm$ 84.3  | 721.0 $\pm$ 108.0 | 11.4 $\pm$ 1.8 | 15.1 $\pm$ 1.9 | 81.9 $\pm$ 9.4 | 95.5 $\pm$ 1.5 |
| Uranium     | F1         | 48.2 $\pm$ 12.2  | 39.2 $\pm$ 14.1  | 469.3 $\pm$ 72.2  | -                 | 8.9 $\pm$ 1.6  | 12.3 $\pm$ 2.6 | 78.5 $\pm$ 5.0 | 93.7 $\pm$ 2.3 |
|             | F2         | 5.3 $\pm$ 6.3    | 74.1 $\pm$ 30.3  | 644.3 $\pm$ 52.8  | -                 | 10.8 $\pm$ 1.3 | 15.9 $\pm$ 3.3 | -              | 94.4 $\pm$ 2.2 |

The average reduction of brood size was 42 % in uranium at P0 generation for the N2 population and 55% for Teotónio population but survival was only affected in the N2 population. Moreover, the traits were more affected in both populations at the F1 generation, but in Teotónio population there were an improvement of average trait values at the F2 generation, which was not seen in N2 population. We have two hypotheses for these effects. First, the genetic diversity in the Teotónio population could permit the population to have an evolutionary response to uranium. In N2 population, the improvement could only be achieved through acclimation (see article I; the lower U-concentrations). Second, the concentration of uranium suffered by N2 population was higher. Indeed, the nominal concentration was 1.2 mM U whereas Teotónio population suffered a concentration of 1.1 mM U. Besides, the ICP-AES analyses gave respectively concentration of 1.14 mM and 1.04 mM for the three first generations of exposition to

uranium (see appendix N for ICP-AES analyses). However, the fact that for both populations, the traits responded equivalently at the first generation of exposition led us to privilege the first hypothesis.

### Conclusion

Even if the two populations did not have the same genetic diversity nor the same average trait values of demographic characteristics, they responded similarly in the first generation of exposure to a concentration of uranium. However, the multigenerational responses seem to be dependant of their genetic capacity to face the pollutant and so their genetic diversity.

## Appendix B – Salt bioassay

This appendix is a link between article I and the next ones.

### Introduction

The first aim of article I was to choose a concentration of uranium permitting to obtain a strong intensity of selection on a population, without causing extinction, for our next experiments (see article II-IV). Indeed, as we worked with different pollutants (uranium and salt) we wanted to have a concentration for each pollutant that provokes the same reduction of an endpoint: survival. The same intensity of selection would therefore be used on this trait even if the physiologic effects of uranium and salt are different on *C. elegans*. Since it was not straightforward to find a U-concentration that provides a strong effect on survival of the first generations without extinction in the subsequent generation, we decided to retain fertility as the interest endpoint (brood size) for our next investigations. After survival, fertility is the second life history trait directly related to an individual's fitness (Maynard Smith, 1989). However, we present the effects of salt on survival, fertility and body length to compare it to the results with uranium.

### Material and methods

We did the same experiment than with uranium except for the following changes. We worked with another population of *C. elegans* (Teotónio *et al.*, 2012). Concentration of salt in control environment was 51 mM NaCl as in the classical preparation of NGM



(Stiernagle, 2006), and we also used 8 nominal NaCl-concentrations: 171, 256, 299, 342, 385, 427, 513, 769 mM NaCl. Moreover, we worked on only one generation. We studied survival at 48h (50 individuals / treatment, 5 replicates). We measured body length at 96h on 20 individuals and total brood size on 12 individuals in the first four replicates. We could also measure brood size at 96h since adults were transferred at 96h into a new well. So, even if we did not measure generation time, it is possible to have an index for it with the separation between brood size produced by adults before and after 96h. Indeed, a reduction of brood size before 96h means a slower rate of embryo production.

We did the same analyses than with uranium: concentration-survival regression for the estimation of the  $LC_{50}$  and linear mixed model followed by Dunnett's comparison with a control test for survival, and linear mixed models and Tukey's all-pair comparison tests for the other traits, except that we just had one fixed effects in models, the treatment.

## Results and Discussion

After 2 days of exposure, the mean survival decreased significantly with NaCl-concentration (Figure B1A,  $F_{8,36} = 1402.6$ ,  $P < 0.001$ ). Mean survival in the control was 100%. Mean survival varied from  $93.6 \pm 2.0\%$  at 299 mM NaCl to 0% at 769 mM NaCl (Dunnett,  $P < 0.001$  from 299 mM NaCl). The lethal concentration for 50.0% of individuals ( $LC_{50}$ ) at 48 h was 463 mM (95% CI = 457 – 468). Effects of high salt concentration on *C. elegans* are due directly to the salt concentration but also indirectly by the hypertonicity that increased the effects on survival (Lamitina *et al.*, 2004). However, the effect appears at concentration extremely higher than with uranium, a non-essential heavy metal, for which we found a  $LC_{50}$  270 times lower.

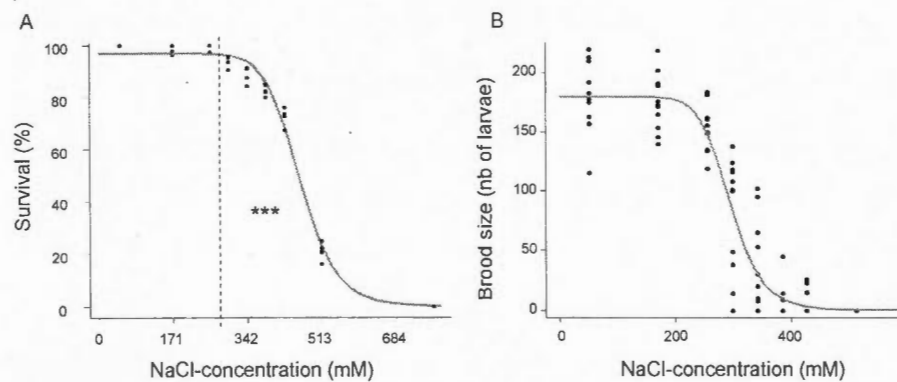


Figure B1. (A) Percentage of *C. elegans* surviving after 48 h of exposure to different NaCl-concentrations. Each concentration was represented by 4 replicates (50 individuals in each replicate). Asterisks indicate significant differences between each U-concentration and the control (\*\*\*:  $P < 0.001$ ) and are present for all concentrations at the right of the dash line. The continuous line is the concentration-survival curve. (B) Brood size of 12 individuals of *C. elegans* exposed to different NaCl-concentrations. Each concentration was represented by 12 individuals. The continuous line is the concentration-brood size curve.

Mean body length was 1.12 mm at 96 h in the control (Figure B2A). It decreased significantly with NaCl-concentration ( $F_{6,135} = 217.98$ ,  $P < 0.001$ ), for example at 256 mM the mean body length was 0.92 mm and continued to decrease significantly at each concentration until 0.43 mm at 385 mM (Tukey test,  $P < 0.001$ ). There was also an overall significant decrease in brood size with NaCl-concentration (Figure B2B;  $F_{7,83} = 90.75$ ,  $P < 0.001$ ), significant from 299 mM (Tukey test,  $P < 0.001$ ). Mean brood size in the control was 180.8 larvae, 75.5 larvae at 299 mM NaCl and nearly inexistent from 385 mM. Moreover, we have another interesting effect on brood size before 96h (Figure B2B;  $F_{7,83} = 252.3$ ,  $P < 0.001$ ). At 256 mM, the reduction of total brood size was not significant compared to control but was for the early brood size (Tukey test,  $P < 0.001$ ). Consequently, individuals firstly suffered of slower rate of embryo production before a reduction of the total production of embryos. As with uranium we found significant effects on growth, fertility and generation time of *C. elegans*, although the concentrations of salt were much higher than with uranium and the physiologic effects are not the same.

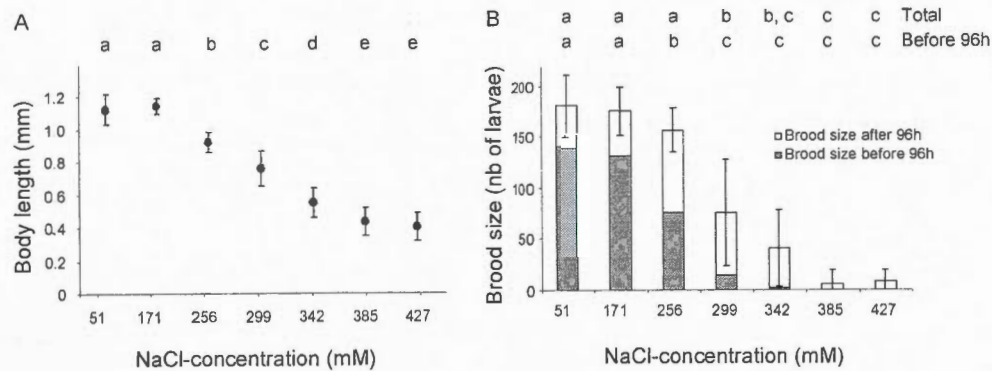


Figure B2. Changes in phenotypic traits of 12 individuals (mean  $\pm$  SD) of *C. elegans* exposed to different NaCl-concentrations (A) body length and (B) total brood size. Different letters on top of the histograms indicated significant differences ( $P < 0.05$ ) between two treatments. For brood size, we showed differences for total brood size and brood size produced by individuals before 96h and added SD of total brood size on the histogram.

The effect concentration for a reduction of 60% brood size ( $EC_{60}$ ) was 307 mM NaCl (95% CI = 298 – 316; Figure B1B). We retained 308 mM (18g/l of NaCl) for our investigations since it correspond to a strong intensity of selection. In uranium we retained a concentration of 1.1 mM since we added an average reduction of brood size of 0.55 % at 1.1 mM U in Teotónio population (see article II). However, we were not able to use a concentration-brood size curve because we did not have enough data for the reduction of brood size contrarily to the salt treatment.

### Conclusion

Survival, growth and reproduction are affected by pollutants, uranium and salt but the effects appear at a much lower concentration for salt. Moreover, our bioassays on both pollutants permitted us to select a concentration that provokes a stronger reduction of fitness from the first generation through a reduction of 60% of fertility.

## Appendix C – Additional Figures and Tables of article II

Table C1. Deviance information criterion (DIC) for multivariate generalized linear mixed-effects models, for different traits within the same environment and for the same trait across different environments, with (Cov) or without (No Cov) genetic covariance between traits allowed in prior. In bold, models for which  $\Delta\text{DIC} > 5$ , i.e. the model including genetic covariance has a smaller DIC.

| Model                 | Cov    | No Cov | $\Delta\text{DIC}$ |
|-----------------------|--------|--------|--------------------|
| Traits in environment |        |        |                    |
| Control               | 25.3   | 41.0   | <b>15.6</b>        |
| Uranium               | -240.7 | -239.6 | 1.1                |
| Salt                  | -66.7  | -54.4  | <b>12.3</b>        |
| Cross-environment     |        |        |                    |
| Brood size            | -24.0  | -23.4  | 0.6                |
| Early growth          | -337.4 | -336.6 | 0.8                |
| Late growth           | 311.5  | 312.1  | 0.6                |
| Survival              | 488.5  | 488.7  | 0.2                |

Table C2. Environmental correlations with their 95% intervals of Bayesian credibility, for traits measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment. Values in bold are significant estimates.

| CONTROL      | Early growth | Late growth                    | Survival                     |
|--------------|--------------|--------------------------------|------------------------------|
| Fertility    |              | <b>-0.188 [-0.188, -0.250]</b> |                              |
| Early growth |              | -0.257 [-0.417, 0.011]         | 0.273 [-0.153, 0.590]        |
| Late growth  |              |                                | <b>0.356 [-0.226, 0.669]</b> |
| URANIUM      | Early growth | Late growth                    | Survival                     |
| Fertility    |              | <b>-0.136 [-0.215, -0.057]</b> |                              |
| Early growth |              |                                |                              |
| Late growth  |              |                                | 0.187 [-0.417, 0.602]        |
| SALT         | Early growth | Late growth                    | Survival                     |
| Fertility    |              |                                |                              |
| Early growth |              |                                |                              |
| Late growth  |              |                                |                              |

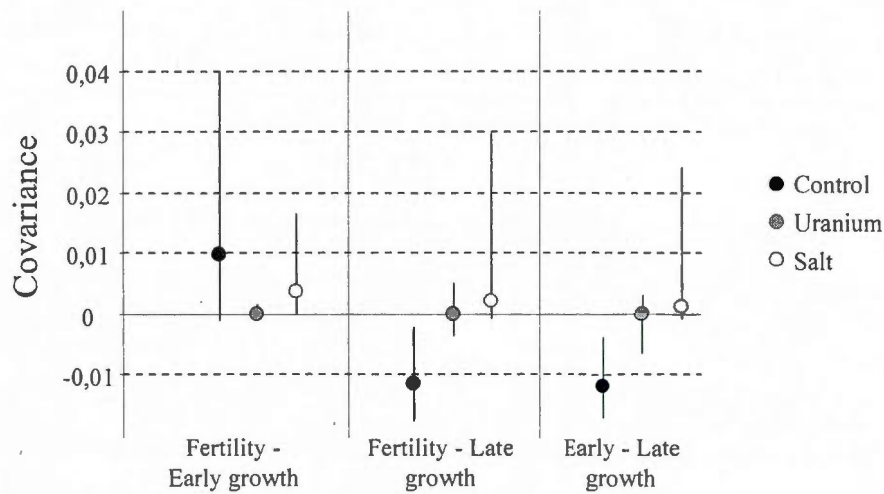


Figure C1. Genetic covariance estimates (and their 95% intervals of Bayesian credibility) between traits measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment.

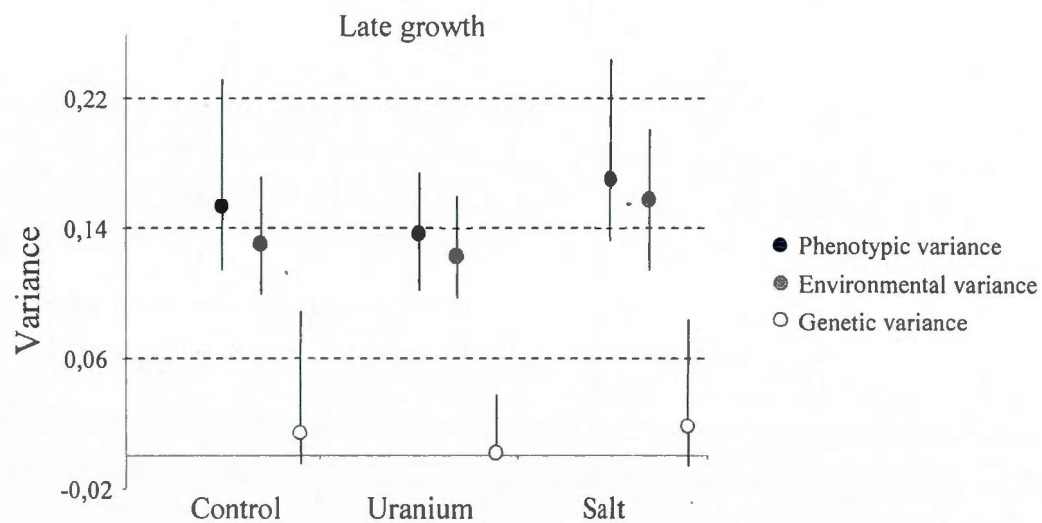


Figure C2. Variance estimates (and their 95% intervals of Bayesian credibility) for late growth measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment. Phenotypic variance ( $V_P$ ) is decomposed in environmental ( $V_E$ ) and genetic variances ( $V_G$ ). Estimates were obtained using multivariate models for different traits within the same environment.



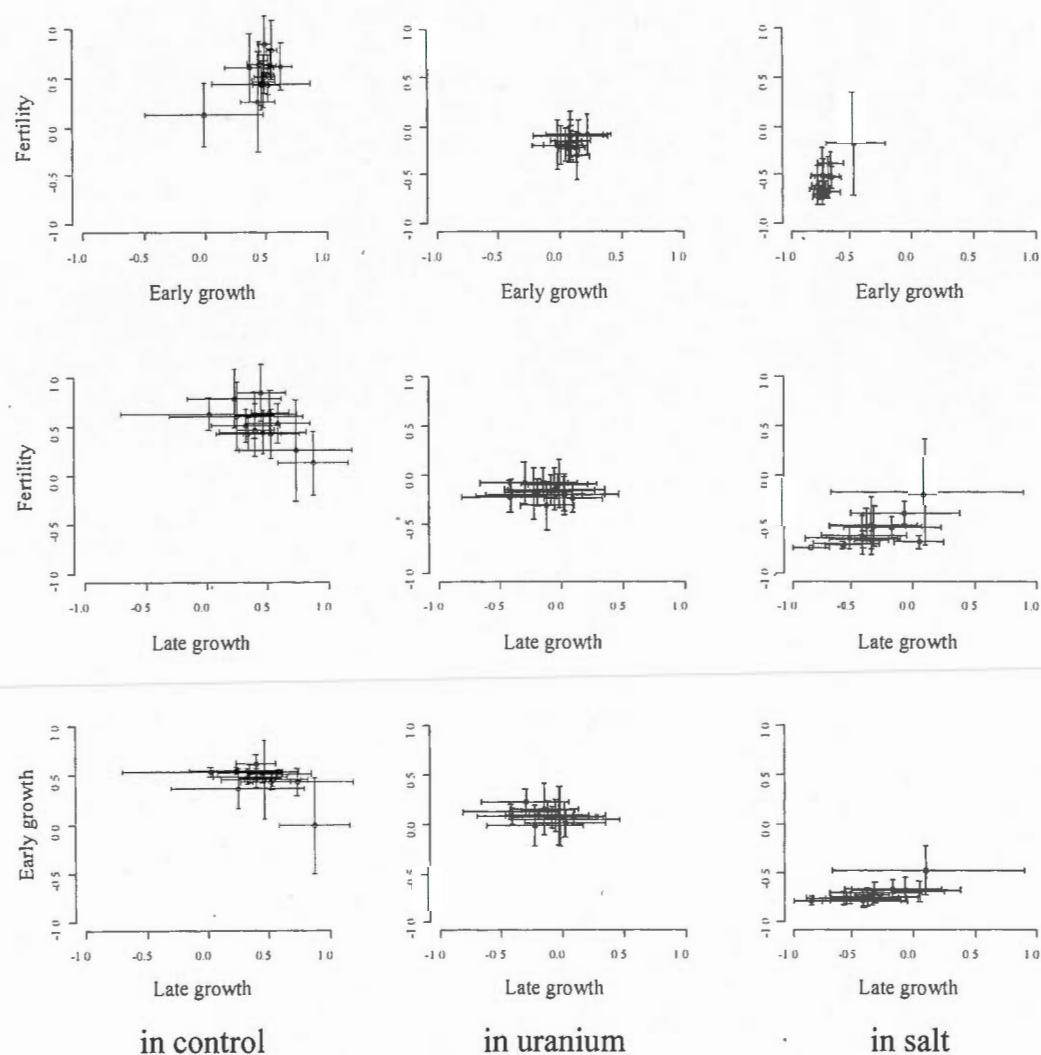


Figure C3. Phenotypic correlation structures between traits (fertility, early and late growth) measured on *C. elegans* in the control, the uranium, and the salt environment. Average values (mean  $\pm$  sd) are represented for each of the 14 isogenic lines.

## Appendix D – Automatic procedure to measure body length

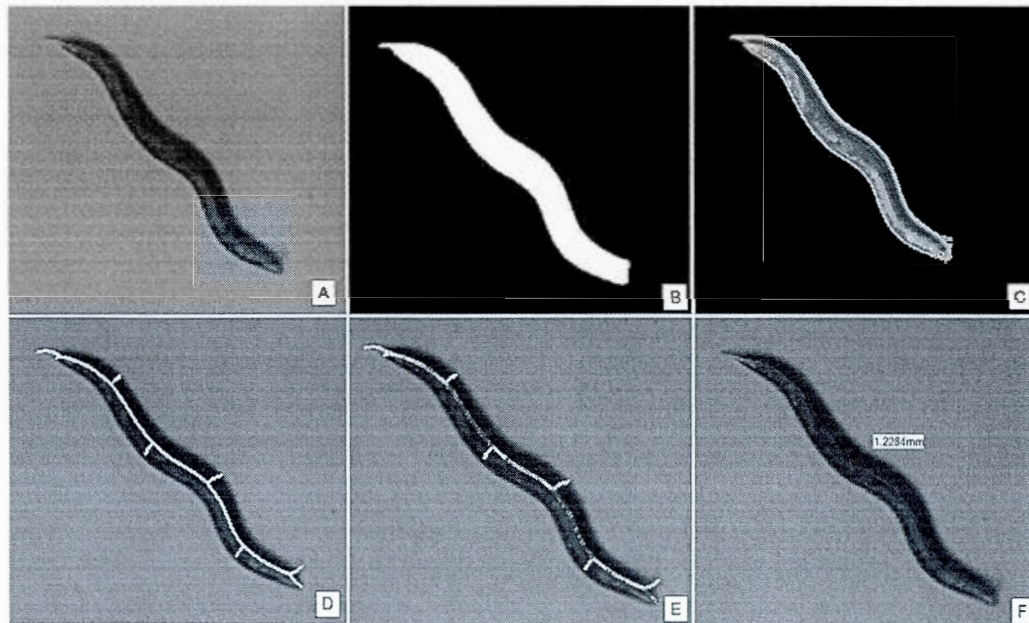


Figure D1. Given an individual body picture (A), the algorithm first applies a background subtraction and a thresholding process in order to differentiate the body from the background (B, C). Then a skeletonization of the body is done (D), and the relevant points on the skeleton are kept (E) to form the basis of the interpolant spline whose length give the precise measure of the body (F) after correction. This one is done regarding the characteristics of the machine in charge of the acquisition process which are : the objective size (OBJ), the captor horizontal width (CAP) in millimeter, the number of pixels horizontally on the captor (PIX) and finally the transfert function (TRANSF). Then, a coefficient of correction is calculated:  $\text{coeff} = \text{CAP} / \text{PIX} / \text{OBJ} / \text{TRANSF}$ . The distance in pixel is multiplied by this coefficient in order to obtain the real distance in millimeter.

## Appendix E – Analyses of first generations

### Introduction

Populations can respond to changes in environmental conditions with adaptive phenotypic plasticity (Price *et al.*, 2003 ; Ghalambor *et al.*, 2007). This type of response is assumed to be restricted to the first few generations after the population meets the novel environmental conditions. In this case, responses of populations can occur through biochemical or physiological changes within an individual's life (Scheiner, 1993 ; Morgan *et al.*, 2007) or through cross-generation phenotypic plasticity (i.e. maternal effects; Mousseau & Fox, 1998 ; Räsänen & Kruuk, 2007). With these mechanisms of acclimation a population can reduce the risks of extinction during the first generations of exposition to the pollutant. The presence of adaptive plasticity in response to a pollutant may also reduce the effects of selection pressures on the population and thus restraint the evolutionary force on life history traits (West-Eberhard, 2003).

### Method, results, and discussion

We considered that the changes occurring during the first four generations included both plastic and evolutionary responses to selection. We thus ran models where we evaluated the phenotypic changes occurring during the first four generations. Models were the same as for evolutionary responses except that we used generation as discrete fixed effect.

In all polluted environments, the traits were affected from the first generations and more strongly in salt than in uranium (Figure E1 and Tables E1, E2, and E3). Moreover, in

uranium, all traits were more significantly affected in the second generation but these effects diminished at the third generation.

Since the traits in uranium were strongly affected at the first generation and the effects was reduced from the third generation, we assumed this acclimation more related to maternal effects (i.e. response through cross-generation phenotypic plasticity rather than within individual's life; Mousseau & Fox, 1998).

Table E1 Effect of generation and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) on hermaphrodite (i.e. growth, total fertility, early and late fertility) and on male (i.e. growth and body bend) traits measured between generation 1 and 4 of the multigenerational experiment. We used multivariate mixed models with all the traits included as dependent variables, and compared different models using deviance information criterion (DIC). All the models included replicates as a random effect to control for dependence of data across generations within each replicate. The first DIC value corresponds to a simple model including only replicates as a random effect. The next values correspond to the DIC of the next model included a given fixed effect and the associated change ( $\Delta$ ) in DIC between the two model included or not included that fixed effect. Except for the models shown at the last line for each sex, covariance between traits was allowed in the priors. In bold, models for which  $\Delta$ DIC  $> 5$ , i.e. the model including interaction had a smaller DIC. Replicate effect in these models represents 4.5% and 3.2% of the total variance for hermaphrodite traits and for male traits, respectively.

| Effect included within the model              | DIC              | $\Delta$ DIC    |
|---|------------------|-----------------|
| <b>for hermaphrodite traits</b>               |                  |                 |
| -   | -988.972         | -               |
| environment                                   | -1003.717        | -14.745         |
| environment + generation                      | -1037.257        | -33.540         |
| environment x generation                      | <b>-1158.856</b> | <b>-121.599</b> |
| environment x generation (without covariance) | 221.466          | 1380.322        |
| <b>for male traits</b>                        |                  |                 |
| -   | 647.481          | -               |
| environment                                   | 617.631          | -29.850         |
| environment + generation                      | 587.358          | -30.273         |
| environment x generation                      | 469.880          | -117.478        |
| environment x generation (without covariance) | <b>471.420</b>   | <b>1.540</b>    |

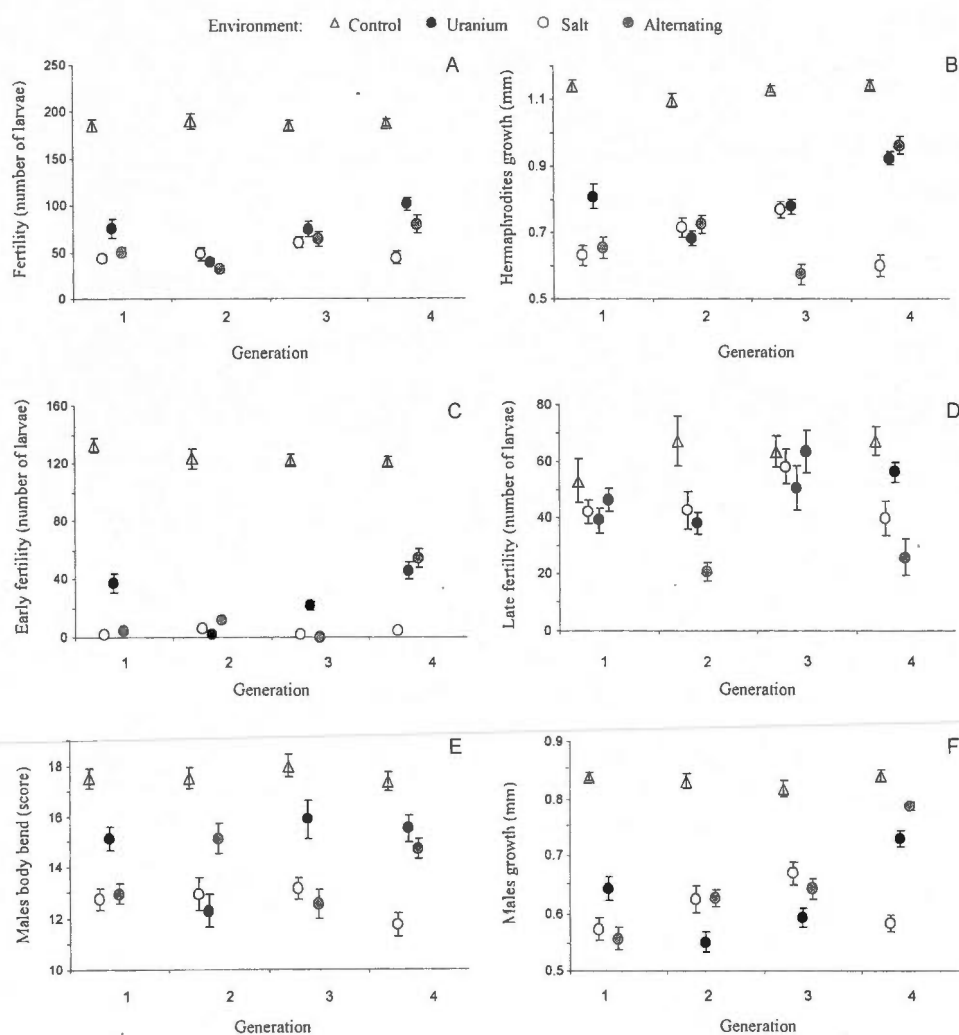


Figure E1. Phenotypic response of hermaphrodite total fertility (A), growth (B), early (C) and late (D) fertility and male growth (E) and body bend (F) between generation 1 and 4. Each symbol corresponds to the mean value of the trait and its standard error on 18 individuals at one particular generation. Control (empty triangle), uranium (filled black dots), salt (empty dots), and alternating uranium and salt (filled grey dots) environments.



Table E2 Analyses of differences between generations (A, C) and environments (B, D) in the first four generations of exposition to uranium, salt and alternating uranium and salt environments for rescaled fertility (A, B) and growth (C, D) of hermaphrodites. Values in bold are significant differences correspond to the 95% interval of highest posterior density that do not overlap 0.

| Fertility                 | Control        |                |                | Uranium        |                |                | Salt           |                |                | Alternating    |                |                |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
|                           |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Comparison                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Generation 1-Generation 2 | -0.033         | -0.201         | 0.109          | <b>0.327</b>   | <b>0.149</b>   | <b>0.489</b>   | -0.053         | -0.203         | 0.114          | 0.144          | -0.026         | 0.296          |
| Generation 2-Generation 3 | 0.031          | -0.123         | 0.209          | <b>-0.308</b>  | <b>-0.451</b>  | <b>-0.120</b>  | -0.139         | -0.284         | 0.065          | <b>-0.250</b>  | <b>-0.439</b>  | <b>-0.101</b>  |
| Generation 3-Generation 4 | -0.012         | -0.171         | 0.131          | <b>-0.234</b>  | <b>-0.433</b>  | <b>-0.111</b>  | 0.165          | -0.018         | 0.329          | <b>-0.158</b>  | <b>-0.344</b>  | <b>-0.009</b>  |
| Generation 1-Generation 4 | 0.017          | -0.191         | 0.121          | <b>-0.255</b>  | <b>-0.388</b>  | <b>-0.061</b>  | 0.015          | -0.171         | 0.175          | <b>-0.261</b>  | <b>-0.477</b>  | <b>-0.135</b>  |

| B                   | Generation 1   |                |                | Generation 2   |                |                | Generation 3   |                |                | Generation 4   |                |                |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
|                     |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Comparison          |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Control-Uranium     | 0.965          | <b>0.784</b>   | <b>1.161</b>   | <b>1.312</b>   | <b>1.143</b>   | <b>1.532</b>   | <b>1.023</b>   | <b>0.827</b>   | <b>1.188</b>   | <b>0.740</b>   | <b>0.593</b>   | <b>0.957</b>   |
| Control-Salt        | <b>1.250</b>   | <b>1.068</b>   | <b>1.436</b>   | <b>1.240</b>   | <b>1.059</b>   | <b>1.439</b>   | <b>1.138</b>   | <b>0.913</b>   | <b>1.300</b>   | <b>1.244</b>   | <b>1.087</b>   | <b>1.458</b>   |
| Control-Alternating | <b>1.255</b>   | <b>1.026</b>   | <b>1.409</b>   | <b>1.401</b>   | <b>1.235</b>   | <b>1.613</b>   | <b>1.137</b>   | <b>0.915</b>   | <b>1.314</b>   | <b>0.961</b>   | <b>0.761</b>   | <b>1.118</b>   |
| Uranium-Salt        | <b>0.280</b>   | <b>0.101</b>   | <b>0.477</b>   | -0.117         | -0.250         | 0.132          | 0.102          | -0.104         | 0.277          | <b>0.519</b>   | <b>0.312</b>   | <b>0.698</b>   |
| Uranium-Alternating | <b>0.270</b>   | <b>0.065</b>   | <b>0.438</b>   | 0.120          | -0.124         | 0.265          | 0.118          | -0.079         | 0.321          | 0.161          | 0.004          | 0.360          |
| Salt-Alternating    | -0.042         | -0.225         | 0.144          | 0.171          | -0.029         | 0.344          | 0.012          | -0.208         | 0.199          | <b>-0.333</b>  | <b>-0.515</b>  | <b>-0.135</b>  |

| C                         | Control        |                |                | Uranium        |                |                | Salt           |                |                | Alternating    |                |                |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
|                           |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Comparison                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Generation 1-Generation 2 | 0.125          | -0.086         | 0.280          | <b>0.306</b>   | <b>0.134</b>   | <b>0.512</b>   | <b>-0.163</b>  | <b>-0.396</b>  | <b>-0.045</b>  | -0.208         | -0.363         | 0.004          |
| Generation 2-Generation 3 | -0.074         | -0.279         | 0.083          | <b>-0.212</b>  | <b>-0.443</b>  | <b>-0.069</b>  | -0.131         | -0.336         | 0.039          | <b>0.394</b>   | <b>0.198</b>   | <b>0.571</b>   |
| Generation 3-Generation 4 | -0.006         | -0.232         | 0.117          | <b>-0.342</b>  | <b>-0.563</b>  | <b>-0.191</b>  | <b>0.436</b>   | <b>0.248</b>   | <b>0.603</b>   | <b>-0.974</b>  | <b>-1.147</b>  | <b>-0.796</b>  |
| Generation 1-Generation 4 | -0.016         | -0.202         | 0.156          | <b>-0.306</b>  | <b>-0.471</b>  | <b>-0.119</b>  | 0.032          | -0.118         | 0.242          | <b>-0.785</b>  | <b>-0.945</b>  | <b>-0.603</b>  |

| D                   | Generation 1   |                |                | Generation 2   |                |                | Generation 3   |                |                | Generation 4   |                |                |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
|                     |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Comparison          |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Control-Uranium     | <b>0.833</b>   | <b>0.650</b>   | <b>1.060</b>   | <b>1.082</b>   | <b>0.805</b>   | <b>1.249</b>   | <b>0.837</b>   | <b>0.655</b>   | <b>1.072</b>   | <b>0.583</b>   | <b>0.345</b>   | <b>0.766</b>   |
| Control-Salt        | <b>1.235</b>   | <b>1.073</b>   | <b>1.494</b>   | <b>0.932</b>   | <b>0.750</b>   | <b>1.168</b>   | <b>0.837</b>   | <b>0.707</b>   | <b>1.102</b>   | <b>1.319</b>   | <b>1.170</b>   | <b>1.552</b>   |
| Control-Alternating | <b>1.281</b>   | <b>1.007</b>   | <b>1.441</b>   | <b>0.945</b>   | <b>0.712</b>   | <b>1.141</b>   | <b>1.389</b>   | <b>1.168</b>   | <b>1.579</b>   | <b>0.517</b>   | <b>0.241</b>   | <b>0.662</b>   |
| Uranium-Salt        | <b>0.486</b>   | <b>0.236</b>   | <b>0.635</b>   | -0.107         | -0.321         | 0.116          | 0.053          | -0.185         | 0.240          | <b>0.778</b>   | <b>0.608</b>   | <b>1.027</b>   |
| Uranium-Alternating | <b>0.445</b>   | <b>0.172</b>   | <b>0.605</b>   | -0.038         | -0.328         | 0.106          | <b>0.445</b>   | <b>0.304</b>   | <b>0.722</b>   | -0.084         | -0.326         | 0.088          |
| Salt-Alternating    | -0.021         | -0.267         | 0.143          | 0.035          | -0.230         | 0.221          | <b>0.507</b>   | <b>0.277</b>   | <b>0.685</b>   | <b>-0.908</b>  | <b>-1.116</b>  | <b>-0.702</b>  |

Table E3 Analyses of differences between generations (A, C) and environments (B, D) in the first four generations of exposition to uranium, salt and alternating uranium and salt environments for rescaled growth (A, B) and body bend frequency (C, D) of males. Values in bold are significant differences correspond to the 95% interval of highest posterior density that do not overlap 0.

| Growth                    | Control        |                |                | Uranium        |                |                | Salt           |                |                | Alternating    |                |                |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Comparison                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Generation 1-Generation 2 | 0.045          | -0.150         | 0.228          | <b>0.430</b>   | <b>0.192</b>   | <b>0.593</b>   | <b>-0.202</b>  | <b>-0.429</b>  | <b>-0.047</b>  | <b>-0.318</b>  | <b>-0.519</b>  | <b>-0.126</b>  |
| Generation 2-Generation 3 | 0.078          | -0.151         | 0.244          | -0.201         | -0.367         | 0.019          | <b>-0.194</b>  | <b>-0.396</b>  | <b>-0.015</b>  | -0.075         | -0.264         | 0.135          |
| Generation 3-Generation 4 | -0.083         | -0.289         | 0.104          | <b>-0.622</b>  | <b>-0.805</b>  | <b>-0.417</b>  | <b>0.424</b>   | <b>0.201</b>   | <b>0.598</b>   | <b>-0.692</b>  | <b>-0.850</b>  | <b>-0.446</b>  |
| Generation 1-Generation 4 | -0.013         | -0.177         | 0.210          | <b>-0.379</b>  | <b>-0.571</b>  | <b>-0.163</b>  | -0.029         | -0.229         | 0.145          | <b>-1.062</b>  | <b>-1.237</b>  | <b>-0.837</b>  |

| Growth              | Generation 1   |                |                | Generation 2   |                |                | Generation 3   |                |                | Generation 4   |                |                |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Comparison          |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Control-Uranium     | <b>0.882</b>   | <b>0.676</b>   | <b>1.111</b>   | <b>1.264</b>   | <b>1.040</b>   | <b>1.453</b>   | <b>1.077</b>   | <b>0.795</b>   | <b>1.218</b>   | <b>0.519</b>   | <b>0.274</b>   | <b>0.699</b>   |
| Control-Salt        | <b>1.192</b>   | <b>0.994</b>   | <b>1.401</b>   | <b>0.959</b>   | <b>0.697</b>   | <b>1.134</b>   | <b>0.625</b>   | <b>0.444</b>   | <b>0.875</b>   | <b>1.147</b>   | <b>0.942</b>   | <b>1.370</b>   |
| Control-Alternating | <b>1.237</b>   | <b>1.047</b>   | <b>1.485</b>   | <b>0.847</b>   | <b>0.698</b>   | <b>1.128</b>   | <b>0.738</b>   | <b>0.576</b>   | <b>0.998</b>   | <b>0.231</b>   | <b>0.005</b>   | <b>0.446</b>   |
| Uranium-Salt        | <b>0.302</b>   | <b>0.111</b>   | <b>0.549</b>   | <b>-0.320</b>  | <b>-0.518</b>  | <b>-0.094</b>  | <b>-0.284</b>  | <b>-0.544</b>  | <b>-0.116</b>  | <b>0.663</b>   | <b>0.449</b>   | <b>0.877</b>   |
| Uranium-Alternating | <b>0.385</b>   | <b>0.171</b>   | <b>0.587</b>   | <b>-0.333</b>  | <b>-0.536</b>  | <b>-0.109</b>  | <b>-0.171</b>  | <b>-0.453</b>  | <b>-0.027</b>  | <b>-0.263</b>  | <b>-0.458</b>  | <b>-0.025</b>  |
| Salt-Alternating    | 0.097          | -0.155         | 0.287          | 0.014          | -0.221         | 0.232          | 0.123          | -0.094         | 0.339          | <b>-0.918</b>  | <b>-1.144</b>  | <b>-0.702</b>  |

| Body bend                 | Control        |                |                | Uranium        |                |                | Salt           |                |                | Alternating    |                |                |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Comparison                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Generation 1-Generation 2 | 0.054          | -0.285         | 0.246          | <b>0.492</b>   | <b>0.273</b>   | <b>0.806</b>   | -0.079         | -0.296         | 0.211          | <b>-0.437</b>  | <b>-0.711</b>  | <b>-0.146</b>  |
| Generation 2-Generation 3 | -0.103         | -0.375         | 0.174          | <b>-0.780</b>  | <b>-0.950</b>  | <b>-0.403</b>  | -0.069         | -0.307         | 0.219          | 0.499          | 0.235          | 0.778          |
| Generation 3-Generation 4 | 0.211          | -0.143         | 0.401          | 0.036          | -0.218         | 0.310          | <b>0.246</b>   | <b>0.006</b>   | <b>0.553</b>   | <b>-0.465</b>  | <b>-0.692</b>  | <b>-0.173</b>  |
| Generation 1-Generation 4 | 0.005          | -0.248         | 0.273          | -0.128         | -0.327         | 0.177          | 0.177          | -0.092         | 0.455          | <b>-0.288</b>  | <b>-0.636</b>  | <b>-0.068</b>  |

| Body bend           | Generation 1   |                |                | Generation 2   |                |                | Generation 3   |                |                | Generation 4   |                |                |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Comparison          |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Control-Uranium     | <b>0.417</b>   | <b>0.193</b>   | <b>0.745</b>   | <b>0.974</b>   | <b>0.741</b>   | <b>1.318</b>   | <b>0.369</b>   | <b>0.109</b>   | <b>0.690</b>   | <b>0.385</b>   | <b>0.098</b>   | <b>0.658</b>   |
| Control-Salt        | <b>0.928</b>   | <b>0.642</b>   | <b>1.220</b>   | <b>0.824</b>   | <b>0.604</b>   | <b>1.171</b>   | <b>0.974</b>   | <b>0.665</b>   | <b>1.210</b>   | <b>1.036</b>   | <b>0.802</b>   | <b>1.350</b>   |
| Control-Alternating | <b>0.891</b>   | <b>0.591</b>   | <b>1.184</b>   | <b>0.413</b>   | <b>0.162</b>   | <b>0.740</b>   | <b>1.030</b>   | <b>0.782</b>   | <b>1.321</b>   | <b>0.460</b>   | <b>0.266</b>   | <b>0.813</b>   |
| Uranium-Salt        | <b>0.450</b>   | <b>0.164</b>   | <b>0.725</b>   | -0.158         | -0.394         | 0.146          | <b>0.577</b>   | <b>0.243</b>   | <b>0.825</b>   | <b>0.696</b>   | <b>0.458</b>   | <b>1.007</b>   |
| Uranium-Alternating | <b>0.506</b>   | <b>0.154</b>   | <b>0.714</b>   | <b>-0.545</b>  | <b>-0.816</b>  | <b>-0.233</b>  | <b>0.647</b>   | <b>0.366</b>   | <b>0.935</b>   | <b>0.130</b>   | <b>-0.163</b>  | <b>0.407</b>   |
| Salt-Alternating    | -0.084         | -0.329         | 0.233          | -0.476         | -0.719         | -0.155         | 0.148          | -0.148         | 0.408          | <b>-0.509</b>  | <b>-0.850</b>  | <b>-0.283</b>  |

## Appendix F – Analyses for survival and sex ratio

### Method and results

We used univariate models to analyse the changes in mean survival, sex ratio (presented in Material and Methods). We could not find any difference in survival between males and hermaphrodites at the first generation of exposition to pollutants (Figure F1B), and thus analysed data for sex ratio starting at generation 2. Data on survival, sex-ratio, and population size were not transformed. Survival (i.e. alive and dead at 48h) and sex ratio (i.e. hermaphrodites and males) followed a binomial distribution. We thus modelled these traits using a binomial error structure without having to change the burn-in phase or the thinning interval to obtain acceptable levels of autocorrelation.

From the first generation of exposition survival was affected in all polluted treatments, slightly in uranium treatment ( $>95\%$ ; Figure F1A and Table F1, F2) and more severely in salt ( $<70\%$ ). A reduction of the ratio of males existed in uranium and in alternating treatment in the first generations of exposition compared to control populations but this effect was reduced in few generations and was dependant of the replicates for 40% (Figure F1B and Table F1, F2).



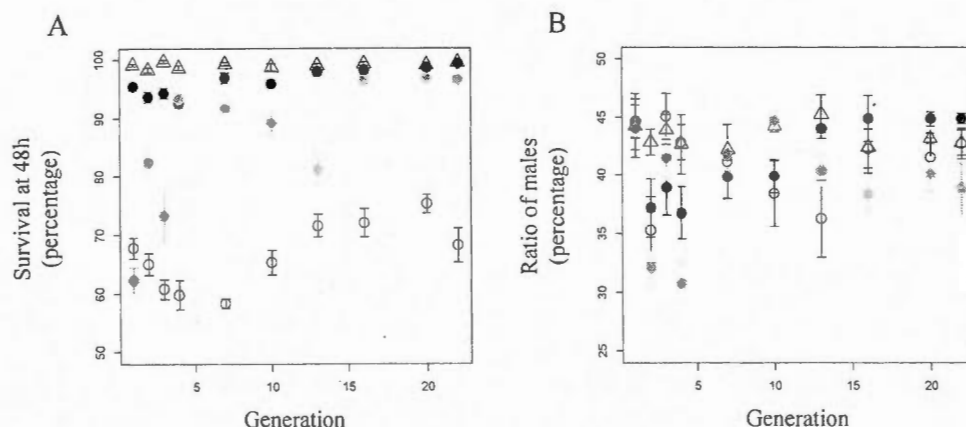


Figure F1. Changes in average survival (A) and sex ratio (B) in the different treatments, between generation 1 and 22. Symbols show the mean value and standard error over 6 replicated populations in control (empty triangle), uranium (filled black dots), salt (empty dots), and alternating uranium and salt (filled grey dots) treatments.

Table F1. Effect of generation and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) on survival (A) and sex ratio (B) between generation 1 (generation 2 for sex ratio) and 22 of the multigenerational experiment. We used multivariate mixed models with all the traits included as dependent variables, and compared different models using deviance information criterion (DIC). All the models included replicates as a random effect to control for dependence of data across generations within each replicate. The first DIC value corresponds to a simple model including only replicates as a random effect. The next values correspond to the DIC of the next model included a given fixed effect and the associated change ( $\Delta$ ) in DIC between the two model included or not included that fixed effect. In bold, models for which  $\Delta\text{DIC} > 5$ , i.e. the models including interaction had a smaller DIC, for which the replicate effect was 6.4% and 40.3% for survival and for sex ratio, respectively.

| A                                |                  |                |
|----------------------------------|------------------|----------------|
| Effect included within the model | DIC              | $\Delta$ DIC   |
| -                                | 15467.060        | -              |
| environment                      | 15460.170        | -6.890         |
| environment + generation         | 15434.400        | -25.770        |
| environment x generation         | <b>15422.500</b> | <b>-11.900</b> |

| B                                |                  |               |
|----------------------------------|------------------|---------------|
| Effect included within the model | DIC              | $\Delta$ DIC  |
| -                                | 28155.000        | -             |
| environment                      | 28149.490        | -5.510        |
| environment + generation         | 28141.250        | -8.240        |
| environment x generation         | <b>28134.190</b> | <b>-7.060</b> |

Table F2. Analyses of differences for survival and sex ratio Intercept corresponds to the rescaled traits at the generation 1 (or generation 2 for sex ratio) and slope corresponds to the slope of linear regressions across generations. Values correspond to the estimation given by the posterior mode of the distribution for each parameter (i.e. intercept and slope) in control (first line for each parameter) or for each parameter in each environments relative to the others. Values between brackets correspond to the limit of the 95% highest posterior density interval (HPDI). Values in bold are those for which the 95% HPDI did not overlap 0.

| Comparison          | Survival |   |                   | Sex ratio |   |                   |
|---------------------|----------|---|-------------------|-----------|---|-------------------|
| Intercep            |          |   |                   |           |   |                   |
| Control             | 4.621    | [ | 4.176 ; 5.041 ]   | -0.260    | [ | -0.358 ; -0.159 ] |
| Control-Uranium     | -2.012   | [ | -2.488 ; -1.500 ] | -0.281    | [ | -0.441 ; -0.131 ] |
| Control-Salt        | -4.148   | [ | -4.638 ; -3.681 ] | -0.107    | [ | -0.255 ; 0.113 ]  |
| Control-Alternating | -3.529   | [ | -4.077 ; -3.036 ] | -0.298    | [ | -0.426 ; -0.127 ] |
| Uranium-Salt        | 2.134    | [ | 1.783 ; 2.546 ]   | -0.205    | [ | -0.355 ; 0.027 ]  |
| Uranium-Alternating | 1.514    | [ | 1.132 ; 1.910 ]   | 0.020     | [ | -0.150 ; 0.195 ]  |
| Salt-Alternating    | -0.599   | [ | -0.978 ; -0.293 ] | 0.207     | [ | 0.008 ; 0.408 ]   |
| Slope               |          |   |                   |           |   |                   |
| Control             | 0.026    | [ | -0.011 ; 0.063 ]  | -0.001    | [ | -0.007 ; 0.006 ]  |
| Control-Uranium     | 0.071    | [ | 0.027 ; 0.115 ]   | 0.018     | [ | 0.007 ; 0.029 ]   |
| Control-Salt        | -0.002   | [ | -0.044 ; 0.038 ]  | 0.002     | [ | -0.010 ; 0.016 ]  |
| Control-Alternating | 0.085    | [ | 0.043 ; 0.130 ]   | 0.010     | [ | -0.001 ; 0.021 ]  |
| Uranium-Salt        | 0.070    | [ | 0.040 ; 0.105 ]   | 0.019     | [ | 0.003 ; 0.030 ]   |
| Uranium-Alternating | -0.016   | [ | -0.047 ; 0.020 ]  | 0.008     | [ | -0.004 ; 0.019 ]  |
| Salt-Alternating    | -0.091   | [ | -0.113 ; -0.063 ] | -0.003    | [ | -0.021 ; 0.006 ]  |



## Appendix G – Analyses of traits variance between replicates

### Method

We used univariate models to analyse the changes on the variance of life history traits with generation and environment. We calculated the standard deviation of rescaled traits for each of the six replicates per environment and generation, thus there was any random effect included in these models. Priors and parameters values were the same than in the models for evolutionary responses (Table G1, G2 and Figure G1 – G8).

Table G1 Comparison of models for variance of traits (i.e. hermaphrodite total, early and late fertility, and male growth and body bend) measured between generation 4 and 22 of the multigenerational experiment. We used multivariate mixed models with or without interaction between fixed effects (environment and generation), and compared models using deviance information criterion (DIC). Row where DIC is written correspond to a first model and the subsequent value correspond to the associated change ( $\Delta$ ) in DIC estimates that occurs when the effect is included within the model. In bold, models for which  $\Delta\text{DIC} > 5$ , i.e. models providing the best fit.

| Trait           | DIC (without interaction) | $\Delta$ DIC (with interaction) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------------|
| Total fertility | -383.949                  | <b>-9.537</b>                   |
| Early fertility | -436.544                  | <b>-14.062</b>                  |
| Late fertility  | -88.297                   | <b>-9.236</b>                   |
| Growth H        | <b>-314.905</b>           | 1.244                           |
| Growth M        | <b>-273.950</b>           | -4.231                          |
| Body bend       | <b>-155.179</b>           | 3.504                           |

Table G2 Analyses of difference for variance traits for hermaphrodite total fertility (A), growth (B), early (C) and late (D) fertility and male growth (E) and body bend (F) in the multi-generational experiment between generation 4 and 22. Intercept corresponds to the variance of traits at the first generation (i.e. generation 4) and slope corresponds to the slope of linear regressions across generations. Values correspond to the estimation given by the posterior mode of the distribution for each parameter (i.e. intercept and slope) in control (first line for each parameter) or for each parameter in polluted (uranium, salt and alternating) environment relative control. However, when we selected a model without interaction between fixed effects (i.e. environment and generation), there was only one slope for all treatments. There was also the 95% highest and lowest of highest posterior density (HPD) interval. Values in bold are those for which the 95% HPD interval did not overlap 0.

| A         |                    |                |                |                |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Total fertility in | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control            | <b>0.189</b>   | <b>0.152</b>   | <b>0.229</b>   |
|           | Uranium            | 0.044          | -0.016         | 0.102          |
|           | Salt               | -0.034         | -0.088         | 0.028          |
|           | Alternating        | -0.041         | -0.096         | 0.023          |
| slope     | Control            | -0.003         | -0.006         | 0.000          |
|           | Uranium            | -0.001         | -0.007         | 0.003          |
|           | Salt               | <b>0.007</b>   | <b>0.002</b>   | <b>0.011</b>   |
|           | Alternating        | <b>0.006</b>   | <b>0.001</b>   | <b>0.011</b>   |

| C         |                    |                |                |                |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Early fertility in | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control            | <b>0.162</b>   | <b>0.123</b>   | <b>0.197</b>   |
|           | Uranium            | -0.022         | -0.080         | 0.032          |
|           | Salt               | <b>-0.130</b>  | <b>-0.180</b>  | <b>-0.077</b>  |
|           | Alternating        | <b>-0.115</b>  | <b>-0.167</b>  | <b>-0.060</b>  |
| slope     | Control            | -0.003         | -0.006         | 0.000          |
|           | Uranium            | 0.001          | -0.003         | 0.006          |
|           | Salt               | 0.004          | 0.000          | 0.008          |
|           | Alternating        | <b>0.009</b>   | <b>0.005</b>   | <b>0.013</b>   |

| E         |                |                |                |                |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Male growth in | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control        | <b>0.231</b>   | <b>0.193</b>   | <b>0.275</b>   |
|           | Uranium        | 0.040          | -0.005         | 0.087          |
|           | Salt           | <b>0.074</b>   | <b>0.030</b>   | <b>0.127</b>   |
|           | Alternating    | <b>0.050</b>   | <b>0.002</b>   | <b>0.096</b>   |
| slope     | Control        | -0.004         | -0.007         | -0.002         |

| B         |             |                |                |                |
|-----------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Growth in   | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control     | <b>0.161</b>   | <b>0.126</b>   | <b>0.202</b>   |
|           | Uranium     | <b>0.051</b>   | <b>0.006</b>   | <b>0.092</b>   |
|           | Salt        | <b>0.114</b>   | <b>0.072</b>   | <b>0.159</b>   |
|           | Alternating | <b>0.081</b>   | <b>0.036</b>   | <b>0.126</b>   |
| slope     | Control     | -0.002         | -0.004         | 0.000          |

| D         |                   |                |                |                |
|-----------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Late fertility in | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control           | <b>0.442</b>   | <b>0.369</b>   | <b>0.531</b>   |
|           | Uranium           | -0.049         | -0.168         | 0.066          |
|           | Salt              | <b>-0.119</b>  | <b>-0.237</b>  | <b>0.000</b>   |
|           | Alternating       | <b>-0.136</b>  | <b>-0.255</b>  | <b>-0.013</b>  |
| slope     | Control           | -0.008         | -0.015         | -0.002         |
|           | Uranium           | 0.000          | -0.010         | 0.009          |
|           | Salt              | <b>0.017</b>   | <b>0.008</b>   | <b>0.025</b>   |
|           | Alternating       | 0.006          | -0.004         | 0.016          |

| F         |              |                |                |                |
|-----------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter | Body bend in | Posterior mode | Lower estimate | Upper estimate |
| Intercept | Control      | <b>0.329</b>   | <b>0.281</b>   | <b>0.387</b>   |
|           | Uranium      | <b>0.077</b>   | <b>0.021</b>   | <b>0.142</b>   |
|           | Salt         | 0.035          | -0.022         | 0.097          |
|           | Alternating  | <b>0.048</b>   | <b>-0.011</b>  | <b>0.108</b>   |
| slope     | Control      | -0.003         | -0.006         | 0.000          |

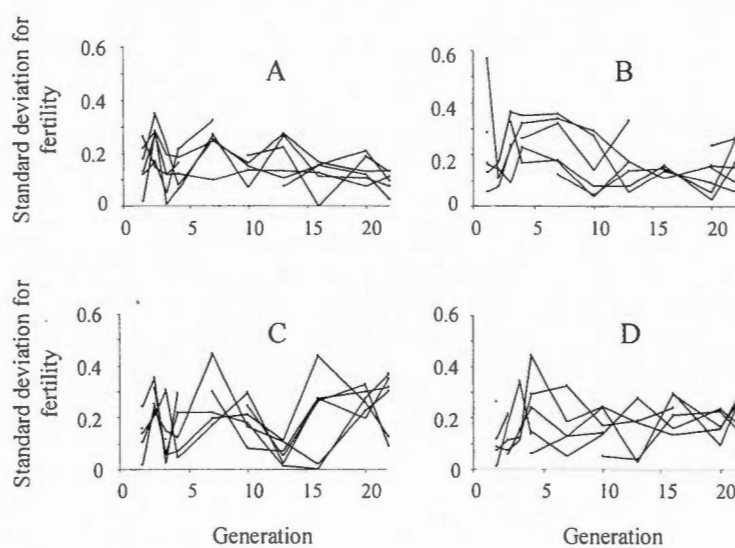


Figure G1. Standard deviations of fertility in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

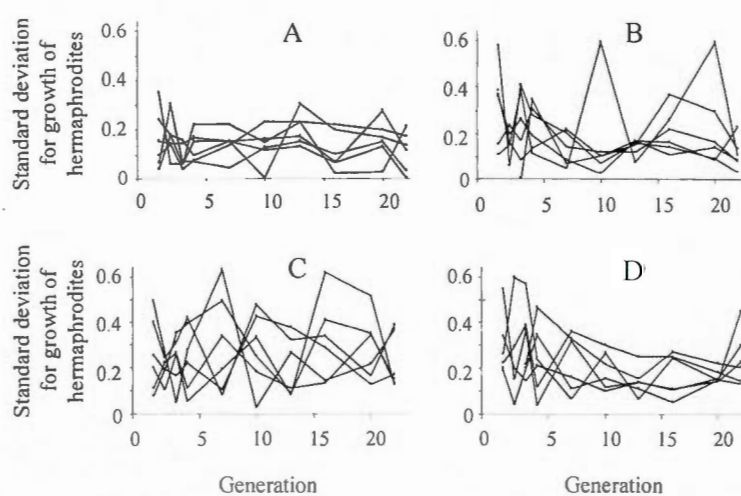


Figure G2. Standard deviations of hermaphrodite growth in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

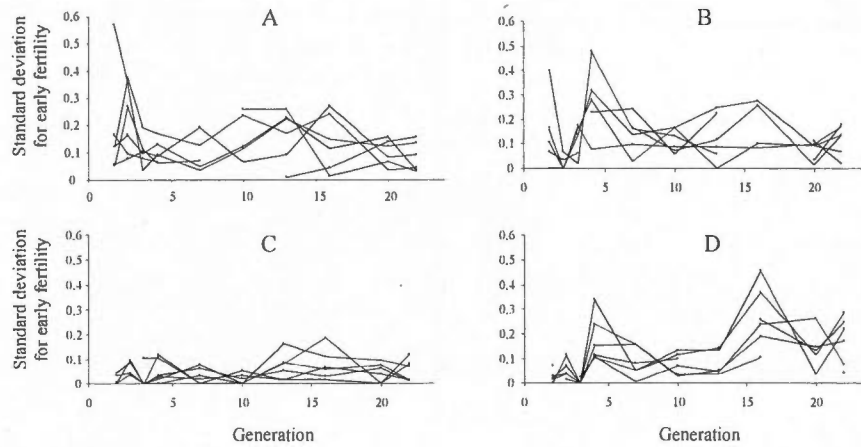


Figure G3. Standard deviations of early fertility in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

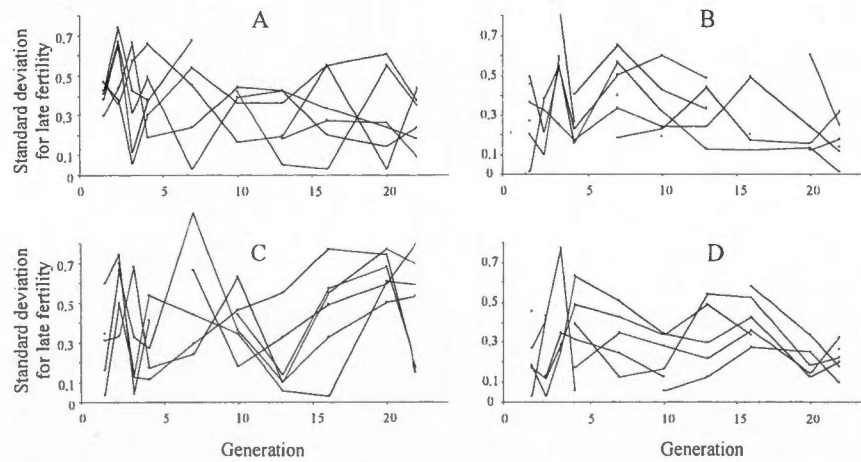


Figure G4. Standard deviations of late fertility in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

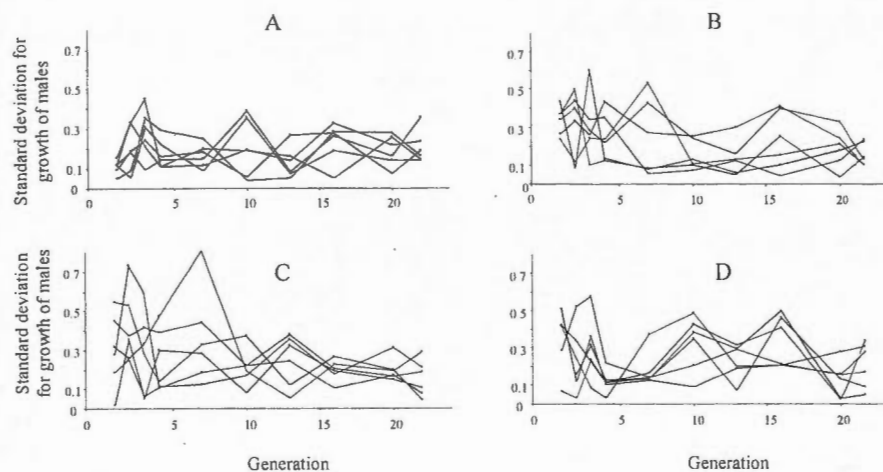


Figure G5. Standard deviations of male growth in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

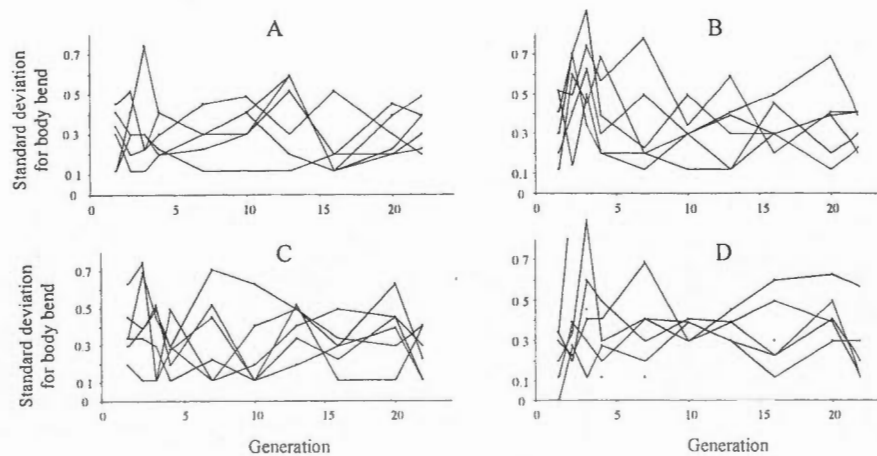


Figure G6. Standard deviations of male body bend frequency in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.



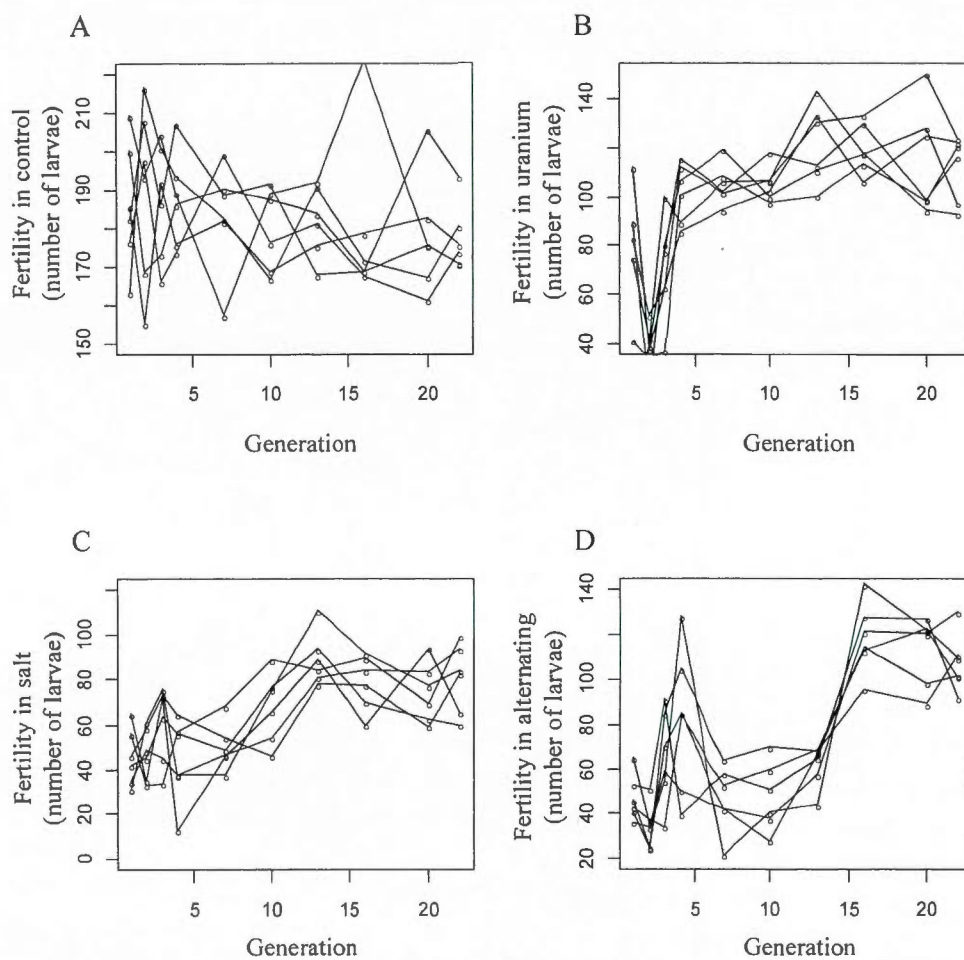


Figure G7. Average for hermaphrodite fertility in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

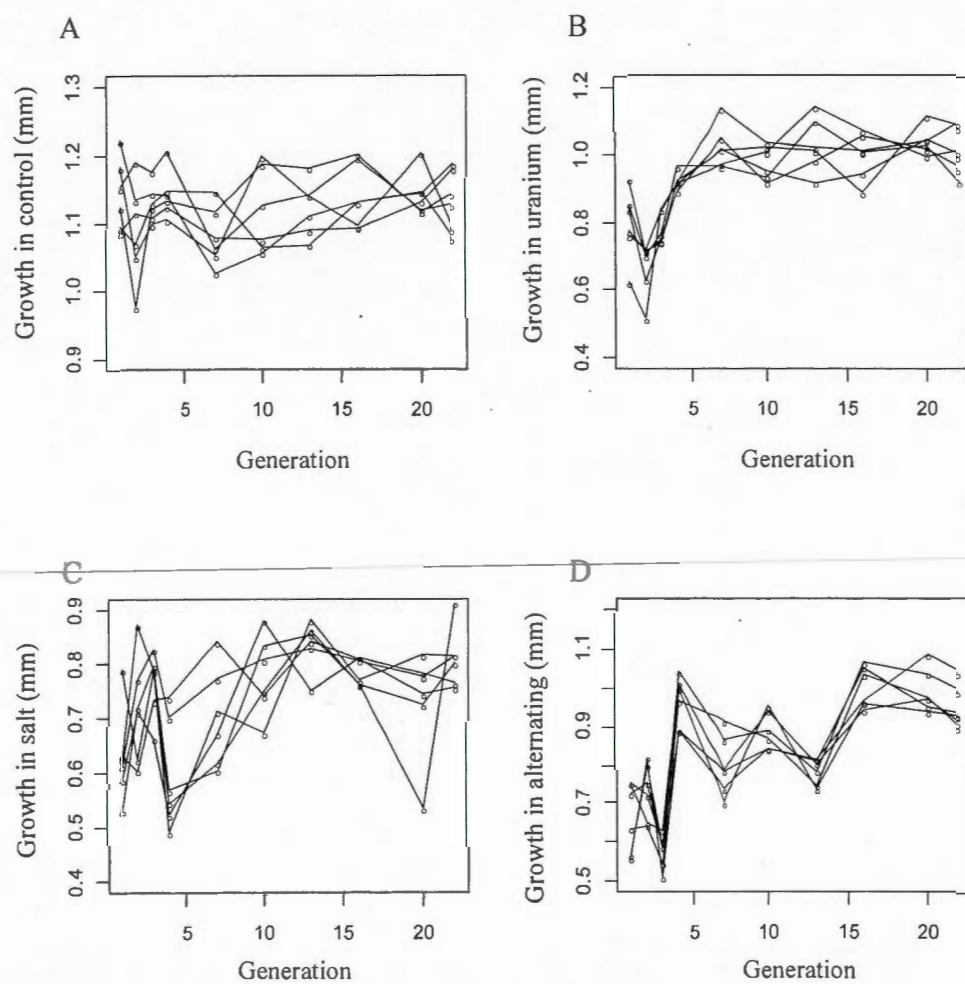


Figure G8. Average for hermaphrodite growth in each of the 6 replicate populations, between generation 1 and 22, in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments.

## Appendix H – Analyses of covariance in bivariate models

Table H1. Effect of covariance between hermaphrodite traits (i.e. growth, total fertility, early and late fertility) for all combination of two traits, measured between generation 4 and 22 of the multigenerational experiment. We used bivariate mixed models with traits included as dependent variables, and compared models with covariance, allowed (Y) or not allowed (N) in the priors, using deviance information criterion (DIC). The associated change ( $\Delta$ ) in DIC between the bivariate models corresponds to the difference between the DIC of the models, including or not the covariance. We retained, as best fitted model, the model with the lowest DIC. All the models included replicates as a random effect to control for dependence of data across generations within each replicate, and environment (control, uranium, salt, and alternating uranium and salt) and generation as fixed effects.

| Traits included            | Cov | DIC      | $\Delta$ DIC |
|----------------------------|-----|----------|--------------|
| Growth and total fertility | Y   | 23.519   | -            |
|                            | N   | 78.248   | 54.729       |
| Growth and early fertility | Y   | -114.279 | -            |
|                            | N   | -26.753  | 87.526       |
| Growth and late fertility  | Y   | 621.846  | -            |
|                            | N   | 620.699  | -1.147       |
| Total and early fertility  | Y   | -382.267 | -            |
|                            | N   | -185.783 | 196.484      |
| Total and late fertility   | Y   | 230.559  | -            |
|                            | N   | 461.129  | 230.570      |
| Early and late fertility   | Y   | 338.009  | -            |
|                            | N   | 357.502  | 19.493       |

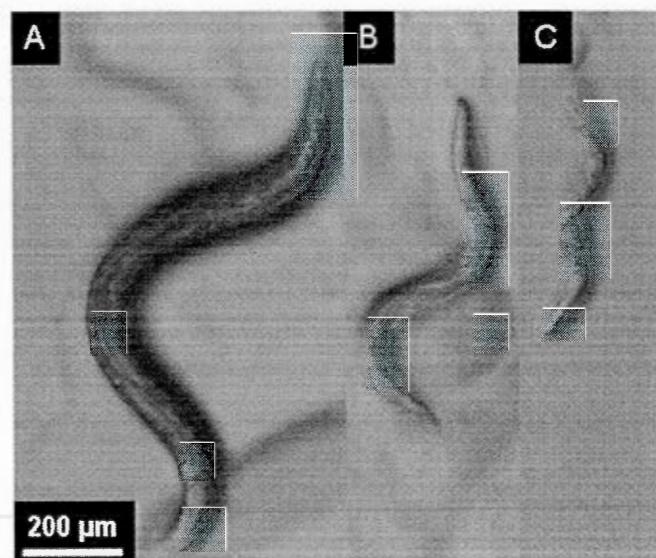
Appendix J – Pictures of *C. elegans* in the multigenerational experiment

Figure J1. Hermaphrodites at 96h of age in the multigenerational experiment, at generation 3, and in the control (A), the salt (B), and the uranium (C) environments. The three pictures are at the same scale.

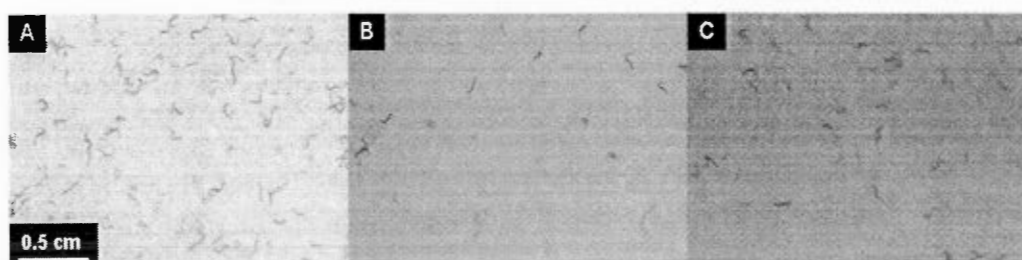


Figure J2. *C. elegans* populations after three days in a Petri dish (500 individuals were placed in the Petri dish the first day), in the multigenerational experiment, at generation 3, and in the control (A), the salt (B), and the uranium (C) environments. The three pictures are at the same scale.

## Appendix K Relationship between fertility and growth

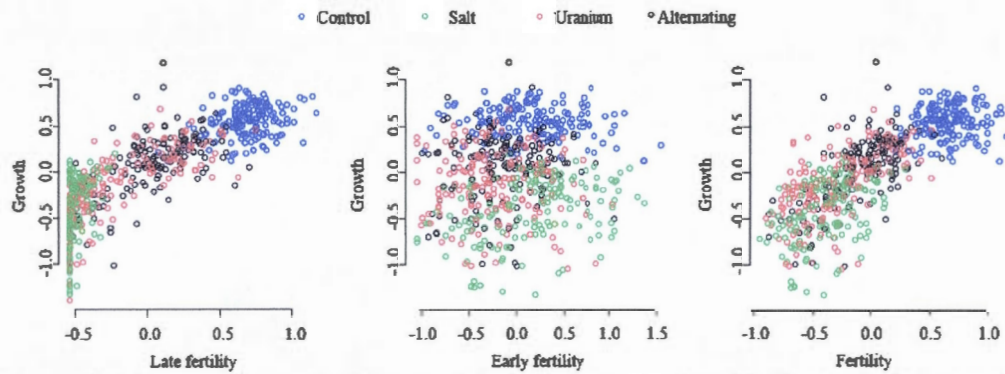


Figure K1. Measures of hermaphrodites growth (individual) as a function of fertility (early, late or total) between generation 1 and 22 in control (blue), uranium (red), salt (green) and alternating uranium and salt (black) environments. Traits were rescaled.



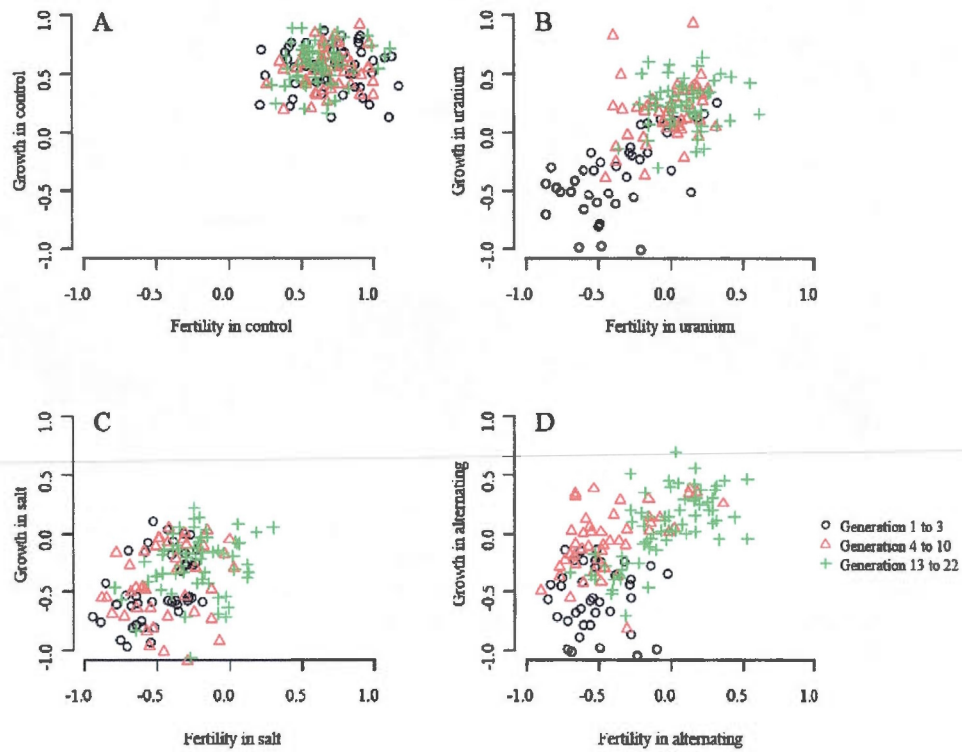


Figure K2. Measures of hermaphrodites growth (individual) as a function of total fertility in control (A), uranium (B), salt (C) and alternating uranium and salt (D) environments from generation 1 to 3 (black dots), 4 to 10 (red triangles), and 13 to 22 (green crosses). Traits were rescaled.

## Appendix L – Additional Figure of article IV

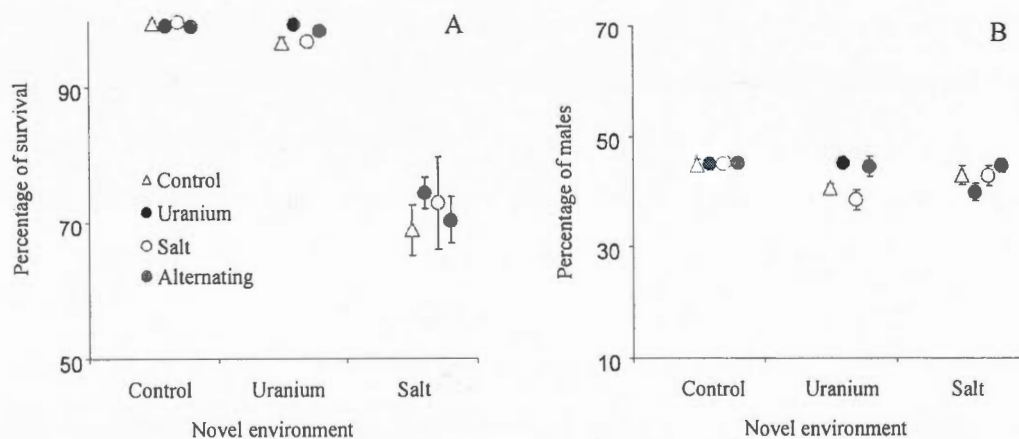


Figure L1, Survival (A) and males (B) percentage during the reciprocal-transplant experiment conducted at generation 18 of the multi-generation experiment. Symbols represent the mean and its associated standard error for 6 replicates with about 100 individuals randomly sampled in each treatment. Control = small dashed line; uranium = black line; salt = large dashed line; alternating U/NaCl treatment = grey line.

## Appendix M – Heritability and evolutionary response

This appendix is a link between the article II and III.

### Introduction and method

Here, we wanted to confirm the constraints due to heritability changes (and genetic correlations) on the potential of evolutionary responses of traits, despite strong selection pressures (Wilson *et al.*, 2006), and from the first generation of exposition to pollutants. We used the estimations of heritability (article II) and evolutionary response (article III) of life history traits. Even if we did not use the estimations of all traits in article II, we also measured growth until 96h and the early and late fertility (before and after 96h). We therefore had an estimation of heritability and evolutionary response for survival, growth between 0 and 96h as well as early, late and total fertility measured in the control, the uranium and the salt environments.

### Results and discussion

Although traits were heritable in the control environment and even more so than in polluted environment, the evolutionary responses of the different traits were not significant (except for late fertility). This is what we expected since there was no novel selection pressure in this environment. Compared to the control, the decrease of heritability was higher in uranium than in the salt environment (article II) and it was the same for evolutionary responses (except for growth but the 95% Bayesian posterior intervals of highest density of the comparison barely overlapped 0; article III). We searched for a linear relation between heritability and evolutionary response

(corresponding to the intensity of selection,  $R = h^2.S$ ) using the Pearson correlation coefficient which is sensitive to linear regression. The correlation was of 0.52 but was non-significant (Figure L1;  $df = 8$ ,  $P = 0.121$ ). However, the correlation for survival and fertility traits was higher and significant ( $r = 0.71$ ,  $df = 6$ ,  $P = 0.048$ ).

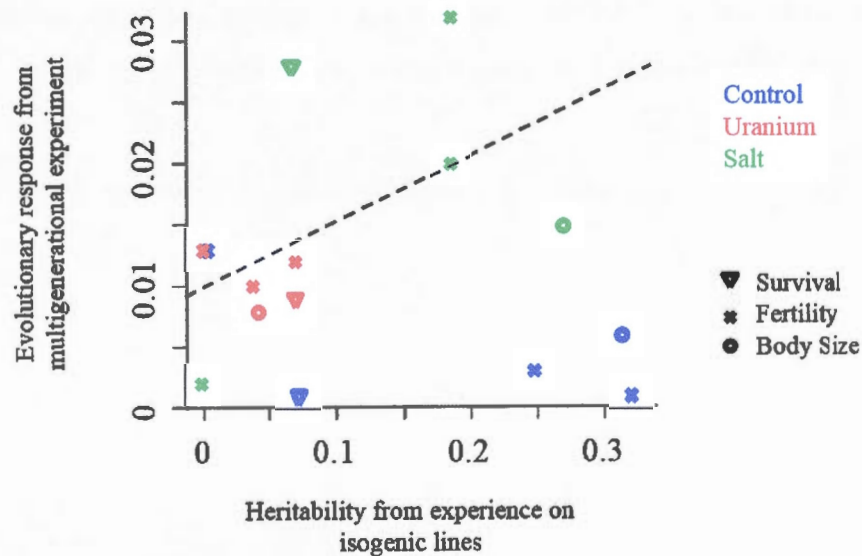


Figure L1. Correlation between evolutionary response and heritability for survival, growth between 0 and 96h as well as early, late and total fertility in the control, the uranium and the salt environments. Each symbol represents the mode posterior of the distribution for the estimates. The dash line shows the linear regression of estimated heritability on the evolutionary response for traits in uranium and salt only, where selection pressures existed.

Even if we saw in article III that the intensity of selection was higher in the salt than in the uranium environment, we showed here that this difference is not so obvious since the correlation (corresponding to the strength of selection) existed. Therefore in uranium compared to salt, the reduction of evolutionary responses in multigenerational experiment can be explained not only by a lower strength of selection but also by the reduction of heritability from the first generation of exposition. Moreover, we confirmed

in article III that the instability tendency of the **G** matrix in uranium was also present throughout generations.

### Conclusion

We confirmed here that the correlation exists between heritability and evolutionary response even when there are strong selection pressures caused by pollution.



## Appendix N – ICP-AES analyses in the multigenerational experiment

At each generation of the multigenerational experiment, we collected an agar sample (100  $\mu$ l) from each medium (control, uranium, salt) just before filling the Petri dishes. We stored the samples at 4°C prior to the measurement of uranium and chlorine concentrations. Samples were digested using a combination of 1 ml  $\text{HNO}_3$  (65%) and 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 90°C, and measurements were obtained using the ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA; detection limit 0.04  $\mu\text{M}$ ). Thus we obtained the NaCl- and U-concentration in the different environments and at each of generation (Figure M1).

The measures were not highly robust considering we took only one sample per condition and generation. Nonetheless, we can say that the concentration in salt was always higher than expected (Figure M1C, average: 324.4 mM NaCl, SD: 14.2), even in the control and uranium environments since we measured concentrations higher than 70 mM NaCl instead of 51 mM (Figure M1A and M1B). In contrast, U-concentration was lower than expected (Figure M1D, average: 1.01 mM U, SD: 0.06). These differences are probably the result of the way we contaminated the agar with uranium and salt. On the one hand, salt was added before autoclaving the medium. Consequently we probably had a slight evaporation of the liquid. Uranium, on the other hand was added at the end of the preparation just before filling the Petri dishes. However, this was not a problem given that we used the same method throughout all our experiments and thus used the same concentrations in every case.

Two mistakes were made which entailed a reduction at generation 4 of NaCl-concentration in the salt environment and a reduction at generation 9 of U-concentration

in the uranium environment. However, we assumed that we did not include an important bias in our results. Indeed, we did not measure the traits at generation 9 and we did not see an improvement of average trait values at generation 4 in the salt environment (article III).

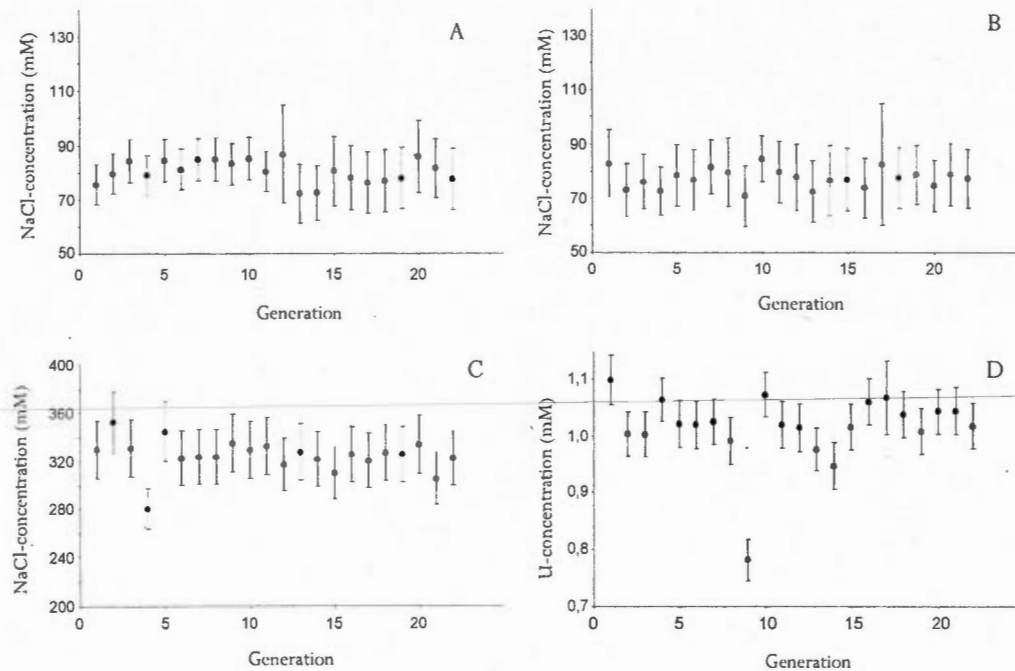


Figure M1. NaCl- (A, B, and C) and U-concentration (D) in the NGM obtained by ICP-AES (estimation  $\pm$  confidence interval of 95%) for control (A), uranium (B, D), and salt environments (C) at each of the 22 generations (article III). The nominal concentrations were 308 mM NaCl and 1.1 mM U.

## REFERENCES

- Abou-Donia, M.B., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Shah, D.U., Bullman, S.L. & Khan, W.A. 2002. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72(4): 881-890.
- AFNOR 1994. Dictionnaire de l'environnement. Les termes normalisés. Lexique français-anglais. La Défense, Paris
- AFSSET 2010. Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes. Maisons-Alfort.
- Agashe, D., Falk, J.J. & Bolnick, D.I. 2011. Effects of founding genetic variation on adaptation to a novel resource. *Evolution* 65(9): 2481-2491.
- Ailion, M. & Thomas, J.H. 2000. Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156(3): 1047-1067.
- Alleaume-Benharira, M., Pen, I.R. & Ronce, O. 2006. Geographical patterns of adaptation within a species' range: Interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* 19(1): 203-215.
- Anderson, G.L., Boyd, W.A. & Williams, P.L. 2001. Assessment of Sublethal Endpoints for Toxicity Testing with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(4): 833-838.

- Anderson, J.B., Sirjusingh, C., Parsons, A.B., Boone, C., Wickens, C., Cowen, L.E. & Kohn, L.M. 2003. Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163(4): 1287-1298.
- Antebi, A., Norris, C.R., Hedgecock, E.M. & Garriga, G. 1997. Cell and Growth Cone Migrations. in: Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. & Priess, J.R. (eds.). *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York., pp. 583-609.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D. & Turner, R.G. 1971. Heavy Metal Tolerance in Plants. *Advances in Ecological Research* 7(C): 1-85.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, N. & Skinner, M.K. 2005. Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308(5727): 1466-1469.
- Araiz, C., Château, M.-T., Descamps, S. & Galas, S. 2008. Quantitative genomics in *Caenorhabditis elegans*: Identification strategies for new human therapeutic targets and molecular mechanisms. *IRBM* 29(5): 289-296.
- Arnold, S.J., Bürger, R., Hohenlohe, P.A., Ajie, B.C. & Jones, A.G. 2008. Understanding the evolution and stability of the G-matrix. *Evolution* 62(10): 2451-2461.
- Aschner, M. & Martinez-Finley, E.J. 2011. Revelations from the nematode *Caenorhabditis elegans* on the complex interplay of metal toxicological mechanisms. *Journal of Toxicology*: art. no. 895236.
- Astles, P.A., Moore, A.J. & Preziosi, R.F. 2006. A comparison of methods to estimate cross-environment genetic correlations. *Journal of Evolutionary Biology* 19(1): 114-122.
- ASTM 2002. ASTM Standard E 2172-01: Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. in. *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials. 11, pp. 1606-1616.

- Athrey, N.R.G., Leberg, P.L. & Klerks, P.L. 2007. Laboratory culturing and selection for increased resistance to cadmium reduce genetic variation in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(9): 1916-1921.
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E. & Soares, A.M.V.M. 2002. Among- and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(5): 1058-1064.
- Barrett, R.D.H. & Schluter, D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 23(1): 38-44.
- Barrière, A. & Félix, M.-A. 2005a. High Local Genetic Diversity and Low Outcrossing Rate in *Caenorhabditis elegans* Natural Populations. *Current Biology* 15(13): 1176-1184.
- Barrière, A. & Félix, M.-A. 2005b. Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: 1-19.
- Barsyte, D., Lovejoy, D.A. & G.J., L. 2001. Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB journal* 15(3): 627-634.
- Bayes, T. 1763. An Essay towards solving a Problem in the Doctrine of Chances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 53: 370-418.
- Beaudouin, R., Dias, V., Bonzom, J.-M. & Péry, A. 2012. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology* 21(4): 1225-1239.
- Bégin, M. & Roff, D.A. 2003. The constancy of the G matrix through species divergence and the effects of quantitative genetic constraints on phenotypic evolution: A case study in crickets. *Evolution* 57(5): 1107-1120.
- Bégin, M., Roff, D.A. & Debat, V. 2004. The effect of temperature and wing morphology on quantitative genetic variation in the cricket *Gryllus firmus*, with an appendix examining the statistical properties of the Jackknife-MANOVA method of matrix comparison. *Journal of Evolutionary Biology* 17(6): 1255-1267.



- Bell, G. & Collins, S. 2008. Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications* 1: 3-16.
- Bell, G. & Gonzalez, A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters* 12(9): 942-948.
- Bergelson, J. & Purrington, C.B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *American Naturalist* 148(3): 536-558.
- Berner, D., Stutz, W.E. & Bolnick, D.I. 2010. Foraging trait (co)variances in stickleback evolve deterministically and do not predict trajectories of adaptive diversification. *Evolution* 64(8): 2265-2277.
- Billoir, E., Péry, A.R.R. & Charles, S. 2007. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling* 203(3-4): 204-214.
- Blows, M.W. & Hoffmann, A.A. 2005. A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology* 86(6): 1371-1384.
- Bonin, B. & Blanc, P.L. 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. in: Métivier, H., éd. (ed.). *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 8-41.
- Bosch, J., Johnson, F.X., Clément, E., Mertens, R. & Roubanis, N. 2009. Panorama of energy: energy statistics to support EU policies and solutions. Technical report. Eurostat.
- Braendle, C., Milloz, J. & Félix, M.-A. 2008. Mechanisms and evolution of environmental responses in *Caenorhabditis elegans*. *Current Topics in Developmental Biology* 80: 171-207.
- Brausch, J.M. & Smith, P.N. 2009. Development of resistance to cyfluthrin and naphthalene among *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 18(5): 600-609.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71-94.

- Bretz, F., Hothorn, T. & Westfall, P. 2010. Multiple comparisons using R. CRC Press, Boca Raton.
- Browne, W.J. & Draper, D. 2006. A Comparison of Bayesian and Likelihood-Based Methods for Fitting Multilevel Models. *Bayesian Analysis* 1(3): 473-514.
- Bubliy, O.A., Loeschcke, V. & Imasheva, A.G. 2001. Genetic variation of morphological traits in *Drosophila melanogaster* under poor nutrition: Isofemale lines and offspring-parent regression. *Heredity* 86(3): 363-369.
- Buckling, A., Brockhurst, M.A., Travisano, M. & Rainey, P.B. 2007. Experimental adaptation to high and low quality environments under different scales of temporal variation. *Journal of Evolutionary Biology* 20(1): 296-300.
- Buckling, A., Kassen, R., Bell, G. & Rainey, P.B. 2000. Disturbance and diversity in experimental microcosms. *Nature* 408(6815): 961-964.
- Burdon, J.J. & Thrall, P.H. 2003. The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biology* 4(9): art. no. 227.
- Byerly, L., Cassada, R.C. & Russell, R.L. 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology* 51(1): 23-33.
- Calow, P. & Sibly, R.M. 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology* 4(3): 283-288.
- Cano, J.M., Laurila, A., Palo, J. & Merilä, J. 2004. Population differentiation in G matrix structure due to natural selection in *Rana temporaria*. *Evolution* 58(9): 2013-2020.
- Carrière, Y., Deland, J.-P., Roff, D.A. & Vincent, C. 1994. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 258(1351): 35-40.
- Cassada, R.C. & Russell, R.L. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode. *Developmental Biology* 46(2): 326-342.
- Charbonneau, P. 2006. Sels de voirie: une utilisation nécessaire, mais lourde de conséquences. *Le Naturaliste Canadien* 130(1): 75-81.

- Charlesworth, B. & Hughes, K.A. 2000. The maintenance of genetic variation in life-history traits. in: Singh, R.S. & Krimbas, C.B. (eds.). *Evolutionary genetics*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 369–392.
- Charmantier, A. & Garant, D. 2005. Environmental quality and evolutionary potential: Lessons from wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272(1571): 1415–1425.
- Charmantier, A., McCleery, R.H., Cole, L.R., Perrins, C., Kruuk, L.E.B. & Sheldon, B.C. 2008. Adaptive Phenotypic Plasticity in Response to Climate Change in a Wild Bird Population. *Science* 320(5877): 800–803.
- Chen, J. & Caswell-Chen, E.P. 2003. Why *Caenorhabditis elegans* adults sacrifice their bodies to progeny. *Nematology* 5(4): 641–645.
- Chen, J. & Caswell-Chen, E.P. 2004. Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology* 36(2): 107–113.
- Cheverud, J.M. 1984. Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. *Journal of Theoretical Biology* 110(2): 155–171.
- Chou, H.-H., Chiu, H.-C., Delaney, N.F., Segrè, D. & Marx, C.J. 2011. Diminishing returns epistasis among beneficial mutations decelerates adaptation. *Science* 332(6034): 1190–1192.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C. & Baudin, J.-P. 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. in: Métivier, H., éd. (ed.). *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 187–211.
- Collins, S. 2011. Many Possible Worlds: Expanding the Ecological Scenarios in Experimental Evolution. *Evolutionary Biology* 38(1): 3–14.
- Conover, D.O. & Schultz, E.T. 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends in Ecology and Evolution* 10(6): 248–252.

- Cooper, T.F. & Lenski, R.E. 2010. Experimental evolution with *E. coli* in diverse resource environments. I. Fluctuating environments promote divergence of replicate populations. *BMC Evolutionary Biology* 10(1): art. no. 11.
- Cooper, V.S. & Lenski, R.E. 2000. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* 407(6805): 736-739.
- Coustau, C., Chevillon, C. & ffrench-Constant, R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: Can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15(9): 378-383.
- Coutellec, M.-A. & Barata, C. 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20(3): 493-496.
- Coutellec, M.-A., Collinet, M. & Caquet, T. 2011. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 20(3): 524-534.
- Dallinger, W. 1878. On the life-history of a minute septic organism: with an account of experiments made to determine its thermal death point. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 27: 332-350.
- David, J.R., Gibert, P., Legout, H., Pétavy, G., Capy, P. & Moreteau, B. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94(1): 3-12.
- Day, T. & Bonduriansky, R. 2011. A unified approach to the evolutionary consequences of genetic and nongenetic inheritance. *American Naturalist* 178(2): E18-E36.
- de Jong, G. 1990. Genotype-by-environment interaction and the genetic covariance between environments: multilocus genetics. *Genetica* 81(3): 171-177.
- de Jong, G. 1995. Phenotypic plasticity as a product of selection in a variable environment. *American Naturalist* 145(4): 493-512.
- de Jong, G. & Van Noordwijk, A.J. 1992. Acquisition and allocation of resources: genetic (co)variances, selection, and life histories. *American Naturalist* 139(4): 749-770.



- Denoël, M., Bichot, M., Ficetola, G.F., Delcourt, J., Yliff, M., Kestemont, P. & Poncin, P. 2010. Cumulative effects of road de-icing salt on amphibian behavior. *Aquatic Toxicology* 99(2): 275-280.
- Denver, D.R., Dolan, P.C., Wilhelm, L.J., Sung, W., Lucas-Lledó, J.I., Howe, D.K., Lewis, S.C., Okamoto, K., Thomas, W.K., Lynch, M. & Baer, C.F. 2009. A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(38): 16310-16314.
- DeWitt, T.J., Sih, A. & Wilson, D.S. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 13(2): 77-81.
- Dhawan, R., Dusenbery, D.B. & Williams, P.L. 1999. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 58(7): 451-462.
- Dhawan, R., Dusenbery, D.B. & Williams, P.L. 2000. A Comparison of Metal-induced Lethality and Behavioral Responses in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(12): 3061-3067.
- Dias, V., Vasseur, C. & Bonzom, J.-M. 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71(3): 574-581.
- Dolgin, E.S., Charlesworth, B., Baird, S.E. & Cutter, A.D. 2007. Inbreeding and Outbreeding Depression in *Caenorhabditis* Nematodes. *Evolution* 61(6): 1339-1352.
- Doroszuk, A., Wojewodzic, M.W., Gort, G. & Kammenga, J.E. 2008. Rapid divergence of genetic variance-covariance matrix within a natural population. *American Naturalist* 171(3): 291-304.
- Døving, K.B. 1991. Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 100(1-2): 247-252.
- Ebert, D. & Mangin, K.L. 1997. The influence of host demography on the evolution of virulence of a microsporidian gut parasite. *Evolution* 51(6): 1828-1837.



- Eränen, J.K. 2008. Rapid evolution towards heavy metal resistance by mountain birch around two subarctic copper-nickel smelters. *Journal of Evolutionary Biology* 21(2): 492-501.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. Prentice Hall, Edimbourg.
- Fanara, J.J., Folguera, G., Iriarte, P.F., Mensch, J. & Hasson, E. 2006. Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 19(3): 900-908.
- Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P. & Lagardère, J.-P. 2008. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Environmental Pollution* 151(1): 148-157.
- Félix, M.-A. 1997. One worm, 959 cells and 13,000 genes | Un ver, 959 cellules et 13,000 genes. *Médecine sciences : M/S* 13(2): 156-165.
- French-Constant, R.H. 2007. Which came first: insecticides or resistance? *Trends in Genetics* 23(1): 1-4.
- Fisher, R.A. 1918. The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 52: 399-433.
- Fisher, R.A. 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R. & Nisbet, R.M. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317 (1-3)(1-3): 207-233.
- Forbes, V.E. & Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(7): 1544-1556.
- Forbes, V.E. & Calow, P. 2002. Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357(1425): 1299-1306.

- Frankenberg-Schwager, M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology* 14(4): 307-320.
- Frankham, R. & Kingsolver, J. 2004. Responses to Environmental Change: Adaptation or Extinction. in: Ferrière, R., Dieckmann, U. & Couvet, D. (eds.). *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge Univ Press, Cambridge, pp. 85-100.
- Freeman, M.N., Peredney, C.L. & Williams, P.L. 1999. Soil bioassay using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *ASTM Special Technical Publication*(1364): 305-318.
- Fuller, R.C., Baer, C.F. & Travis, J. 2005. How and when selection experiments might actually be useful. *Integrative and Comparative Biology* 45(3): 391-404.
- Gagliano, M. & McCormick, M.I. 2007. Maternal condition influences phenotypic selection on offspring. *Journal of Animal Ecology* 76(1): 174-182
- Garant, D., Forde, S.E. & Hendry, A.P. 2007. ~~The multifarious effects of dispersal and~~ gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology* 21(3): 434-443.
- Garant, D., Hadfield, J.D., Kruuk, L.E.B. & Sheldon, B.C. 2008. Stability of genetic variance and covariance for reproductive characters in the face of climate change in a wild bird population. *Molecular Ecology* 17(1): 179-188.
- Garigan, D., Hsu, A.-L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. & Kenyon, C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161(3): 1101-1112.
- Gebhardt-Henrich, S.G. & Van Noordwijk, A.J. 1991. Nestling growth in the great tit. I. Heritability estimates under different environmental conditions. *Journal of Evolutionary Biology* 4(3): 341-362.
- Gelman, A. 2008. Scaling regression inputs by dividing by two standard deviations. *Statistics in Medicine* 27(15): 2865-2873.
- Genet, M. 1995. The discovery of uranic rays: A short step for Henri Becquerel but a giant step for science. , . *Radiochimica Acta* 70/71: 3-12.

- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P. & Reznick, D.N. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21(3): 394-407.
- Gibert, P., Moreteau, B., Scheiner, S.M. & David, J.R. 1998. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila*: Correlated variations between segments. *Genetics Selection Evolution* 30(2): 181-194.
- Gibson, G. & Dworkin, I. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Reviews Genetics* 5: 681-691.
- Gillespie, J.H. & Turelli, M. 1989. Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 121(1): 129-138.
- Gillis, P.L., Diener, L.C., Reynoldson, T.B. & Dixon, D.G. 2002. Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (oligochaeta) and *Chironomus riparius* (diptera): Correlation with reproduction and growth. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9): 1836-1844.
- Giovanetti, A., Fesenko, S., Cozzella, M.L., Asencio, L.D. & Sansone, U. 2010. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 101(6): 509-516.
- Golden, J.W. & Riddle, D.L. 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102(2): 368-378.
- Gomulkiewicz, R. & Kirkpatrick, M. 1992. Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46(2): 390-411.
- Goranson, N.C., Ebersole, J.P. & Brault, S. 2005. Resolving an adaptive conundrum: Reproduction in *Caenorhabditis elegans* is not sperm-limited when food is scarce. *Evolutionary Ecology Research* 7(2): 325-333.
- Gram, W.K. & Sork, V.L. 2001. Association between environmental and genetic heterogeneity in forest tree populations. *Ecology* 82(7): 2012-2021.

- Greene, E. 1989. A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar. *Science* 243(4891): 643-646.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B. & Serrão, J.E. 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31(1): 30-38.
- Guo, Y., Yang, Y. & Wang, D.-Y. 2009. Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reproductive Toxicology* 28(1): 90-95.
- Gutteling, E.W., Doroszuk, A., Riksen, J.A.G., Prokop, Z., Reszka, J. & Kammenga, J.E. 2007. Environmental influence on the genetic correlations between life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98(4): 206-213.
- Haas, J.W. 2000. The Reverend Dr William Henry Dallinger, F.R.S. (1839-1909). *Notes and records of the Royal Society of London* 54(1): 53-65.
- Hadfield, J.D. 2010. ~~MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: The MCMCglmm R package.~~ *Journal of Statistical Software* 33(2): 1-22.
- Hadfield, J.D., Nutall, A., Osorio, D. & Owens, I.P.F. 2007. Testing the phenotypic gambit: Phenotypic, genetic and environmental correlations of colour. *Journal of Evolutionary Biology* 20(2): 549-557.
- Haldane, J.B.S. & Jayakar, S.D. 1963. Polymorphism due to selection of varying direction. *Journal of Genetics* 58(2): 237-242.
- Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G. & Krause, M. 2005. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: Altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(32): 11266-11271.
- Harada, H., Kurauchi, M., Hayashi, R. & Eki, T. 2007. Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66(3): 378-383.
- Hart, A.C. 2006. Behavior. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: 1-67.

- Hart, D.R., McKee, P.M., Burt, A.J. & Goffin, M.J. 1986. Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 12(3): 206-220.
- Harvey, S.C., Shorto, A. & Viney, M.E. 2008. Quantitative genetic analysis of life-history traits of *Caenorhabditis elegans* in stressful environments. *BMC evolutionary biology* 8(1): 15.
- Hassel, K., Pedersen, B. & Söderström, L. 2005. Changes in life-history traits in an expanding moss species: Phenotypic plasticity or genetic differentiation? A reciprocal transplantation experiment with *Pogonatum dentatum*. *Ecography* 28(1): 71-80.
- Head, J.A., Dolinoy, D.C. & Basu, N. 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(2): 221-227.
- Hedrick, P.W. 1974. Genetic variation in a heterogeneous environment. I. Temporal heterogeneity and the absolute dominance model. *Genetics* 78: 757-770.
- Hedrick, P.W. 1976. Genetic variation in a heterogeneous environment. II. Temporal heterogeneity and directional selection. *Genetics* 84: 145-157.
- Hedrick, P.W. 1980. Hitchhiking: a comparison of linkage and partial selfing. *Genetics* 94(3): 791-808.
- Hedrick, P.W. 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annual review of ecology and systematics* 17: 535-566.
- Hedrick, P.W. 1995. Genetic polymorphism in a temporally varying environment: Effects of delayed germination or diapause. *Heredity* 75(2): 164-170.
- Hedrick, P.W. 2006. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: The age of genomics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 67-93.
- Hendrickx, F., Maelfait, J.-P. & Lens, L. 2008. Effect of metal stress on life history divergence and quantitative genetic architecture in a wolf spider. *Journal of Evolutionary Biology* 21(1): 183-193.



- Hendry, A.P., Farrugia, T.J. & Kinnison, M.T. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology* 17(1): 20-29.
- Hendry, A.P. & Gonzalez, A. 2008. Whither adaptation? *Biology and Philosophy* 23(5): 673-699.
- Hendry, A.P. & Kinnison, M.T. 1999. Perspective: The pace of modern life: Measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution* 53(6): 1637-1653.
- Hendry, A.P. & Kinnison, M.T. 2001. An introduction to microevolution: Rate, pattern, process. *Genetica* 112-114: 1-8.
- Hendry, A.P., Nosil, P. & Rieseberg, L.H. 2007. The speed of ecological speciation. *Functional Ecology* 21(3): 455-464.
- Hermisson, J. & Pennings, P.S. 2005. Soft sweeps: Molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation. *Genetics* 169(4): 2335-2352.
- Hillenmeyer, M.E., Fung, E., Wildenhain, J., Pierce, S.E., Hoon, S., Lee, W., Proctor, M., St. Onge, R.P., Tyers, M., Koller, D., Altman, R.B., Davis, R.W., Nislow, C. & Giaever, G. 2008. The chemical genomic portrait of yeast: Uncovering a phenotype for all genes. *Science* 320(5874): 362-365.
- Hiyama, A., Nohara, C., Kinjo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A. & Otaki, J.M. 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2(570).
- Hodgkin, J. 1988. Sexual dimorphism and sex determination. in: Wood, W.B. (ed.). *The nematode C. elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 9, pp. 243-279.
- Hodgkin, J. & Barnes, T.M. 1991. More is Not Better: Brood Size and Population Growth in a Self-Fertilizing Nematode. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 246(1315): 19-24.
- Hodgkin, J. & Partridge, F.A. 2008. *Caenorhabditis elegans* Meets Microsporidia: The Nematode Killers from Paris. *PLoS Biology* 6(12): 2634-2637.

- Hoffmann, A.A. & Merilä, J. 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology and Evolution* 14(3): 96-101.
- Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. 1988. The analysis of quantitative variation in natural populations with isofemale strains. *Genet Sel Evol* 20: 87-98.
- Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. 1991. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, New-York.
- Hoffmann, A.A. & Woods, R. 2001. Trial variability and stress: Canalization, developmental stability and the need for a broad approach. *Ecology Letters* 4(2): 97-101.
- Holloway, G.J., Povey, S. R. & Sibly, R. M. 1990. The effect of new environment on adapted genetic architecture. *Heredity* 64: 323-330.
- Holt, R.D. & Gomulkiewicz, R. 1997. The evolution of species' niches: a population dynamic perspective. in: Othmer, R.G., Adler, F.R., Lewis, M.A. & Dallon, J.C. (eds.). *Case Studies in Mathematical Modelling: Ecology, Physiology, and Cell Biology*. Prentice Hall, Eglewood Cliffs, NJ, pp. 25-50.
- Honnay, O., Adriaens, D., Coart, E., Jacquemyn, H. & Roldan-Ruiz, I. 2007. Genetic diversity within and between remnant populations of the endangered calcareous grassland plant *Globularia bisnagarica* L. *Conservation Genetics* 8(2): 293-303.
- Houle, D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130(1): 195-204.
- Innan, H. & Kim, Y. 2004. Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(29): 10667-11067.
- IPCC 2007. *Fourth Assessment Report: Climate Change*. IPCC, Geneva.
- Iraeta, P., Monasterio, C., Salvador, A. & Díaz, J.A. 2006. Mediterranean hatchling lizards grow faster at higher altitude: A reciprocal transplant experiment. *Functional Ecology* 20(5): 865-872.

- Jansen, M., de Meester, L., Cielen, A., Buser, C.C. & Stoks, R. 2011a. The interplay of past and current stress exposure on the water flea *Daphnia*. *Functional Ecology* 25(5): 974-982.
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., van Doorslaer, W. & de Meester, L. 2011b. Collateral damage: Rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution* 65(9): 2681-2691.
- Jasmin, J.-N. & Kassen, R. 2007. On the experimental evolution of specialization and diversity in heterogeneous environments. *Ecology Letters* 10(4): 272-281.
- Jiang, G.C.-T., Hughes, S., Stürzenbaum, S.R., Evje, L., Syversen, T. & Aschner, M. 2009. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicological Sciences* 111(2): 345-354.
- Jiang, G.C.-T., Tidwell, K., McLaughlin, B.A., Cai, J., Gupta, R.C., Milatovic, D., R., N. & Aschner, M. 2007. Neurotoxic potential of depleted uranium effects in primary cortical neuron cultures and in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences* 99(2): 553-565.
- Johansson, F., Lind, M.I., Ingvarsson, P.K. & Bokma, F. 2012. Evolution of the G-matrix in life history traits in the common frog during a recent colonisation of an island system. *Evolutionary Ecology* 26(4): 863-878.
- Jones, A.G., Arnold, S.J. & Bürger, R. 2003. Stability of the G-matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution* 57(8): 1747-1760.
- Jurgens, B.C., Fram, M.S., Belitz, K., Burow, K.R. & Landon, M.K. 2010. Effects of Groundwater Development on Uranium: Central Valley, California, USA. *Ground Water* 48(6): 913-928.
- Kaplan, R.H. & Cooper, W.S. 1984. The evolution of developmental plasticity in reproductive characteristics: an application of the 'adaptive coin-flipping' principle. *American Naturalist* 123(3): 393-410.
- Kassen, R. 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *Journal of Evolutionary Biology* 15(2): 173-190.

- Kause, A., Saloniemi, I., Morin, J.-P., Haukioja, E., Hanhimäki, S. & Ruohomäki, K. 2001. Seasonally varying diet quality and the quantitative genetics of development time and body size in birch feeding insects. *Evolution* 55(10): 1992-2001.
- Kawecki, T.J. 1994. Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *American Naturalist* 144(5): 833-838.
- Kawecki, T.J. & Ebert, D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7(12): 1225-1241.
- Kawecki, T.J., Lenski, R.E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I. & Whitlock, M.C. 2012. Experimental evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 27(10): 547-560.
- Kessin, R.H., Gundersen, G.G., Zaydfudim, V., Grimson, M. & Blanton, R.L. 1996. How cellular slime molds evade nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10): 4857-4861.
- Khan, A.I., Dinh, D.M., Schneider, D., Lenski, R.E. & Cooper, T.F. 2011. Negative epistasis between beneficial mutations in an evolving bacterial population. *Science* 332(6034): 1193-1196.
- Kingsolver, J.G., Hoekstra, H.E., Hoekstra, J.M., Berrigan, D., Vignieri, S.N., Hill, C.E., Hoang, A., Gibert, P. & Beerli, P. 2001. The strength of phenotypic selection in natural populations. *American Naturalist* 157(3): 245-261.
- Kinoshita, N., Sueki, K., Sasa, K., Kitagawa, J.-I., Ikarashi, S., Nishimura, T., Wong, Y.-S., Satou, Y., Handa, K., Takahashi, T., Sato, M. & Yamagata, T. 2011. Assessment of individual radionuclide distributions from the Fukushima nuclear accident covering central-east Japan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(49): 19526-19529.
- Kiontke, K. & Sudhaus, W. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: 1-14.
- Klerks, P.L. 2002. Adaptation, ecological impacts, and risk assessment: Insights from research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment* 8(5): 971-982.



- Klerks, P.L. & Levinton, J.S. 1989. Rapid evolution of metal resistance in a benthic oligochaete inhabiting a metal-polluted site. *Biological Bulletin* 176: 135-141.
- Klerks, P.L., Xie, L. & Levinton, J.S. 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology* 20(3): 513-523.
- Knight, C.G., Azevedo, R.B.R. & Leroi, A.M. 2001. Testing life-history pleiotropy in *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* 55(9): 1795-1804.
- Kolss, M., Vijendravarma, R.K., Schwaller, G. & Kawecki, T.J. 2009. Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*. *Evolution* 63(9): 2389-2401.
- Koskinen, M.T., Haugen, T.O. & Primmer, C.R. 2002. Contemporary fisherian life-history evolution in small salmonid populations. *Nature* 419(6909): 826-830.
- Kraaijeveld, A.R. & Godfrey, H.C.J. 1997. Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 389(6648): 278-280.
- Kristensen, T.N., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. 2003. Effects of inbreeding and environmental stress on fitness - Using *Drosophila buzzatii* as a model organism. *Conservation Genetics* 4(4): 453-465.
- Kruuk, L.E.B. 2004. Estimating genetic parameters in natural populations using the 'animal model'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1446): 873-890.
- Kruuk, L.E.B., Merilä, J. & Sheldon, B.C. 2003. When environmental variation short-circuits natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 18(5): 207-209.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R. & Finger, S. 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(10): 2198-2203.
- Lagauzère, S., Terrail, R. & Bonzom, J.-M. 2009. Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2): 527-537.



- Lamitina, S.T., Morrison, R., Moeckel, G.W. & Strange, K. 2004. Adaptation of the nematode *Caenorhabditis elegans* to extreme osmotic stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 286(4 55-4): C785-C791.
- Lamitina, S.T. & Strange, K. 2005. Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288 (2 57-2): C467-C474.
- Lamitina, T., Huang, C.G. & Strange, K. 2006. Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(32): 12173-12178.
- LaMunyon, C.W. & Ward, S. 1995. Sperm precedence in a hermaphroditic nematode (*Caenorhabditis elegans*) is due to competitive superiority of male sperm. *Experientia* 51(8): 817-823.
- LaMunyon, C.W. & Ward, S. 1998. Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 265(1409): 1997-2002.
- Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33(1): 402-416.
- Lande, R. 1981. Models of Speciation by Sexual Selection on Polygenic Traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(6): 3721-3725.
- Lande, R. & Arnold, S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37(6): 1210-1226.
- Lande, R. & Shannon, S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50(1): 434-437.
- Lecoutre, B. 2005. Et si vous étiez un bayésien qui s'ignore ? *Revue MODULAD* 32: 92-105.
- Lenski, R.E. 1998. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology* 1(4): 265-270.

- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpson, S.C. & Tadler, S.C. 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *American Naturalist* 138(6): 1315-1341.
- Lestaavel, P., Romero, E., Dhieux, B., Ben Soussan, H., Berradi, H., Dublineau, I., Voisin, P. & Gourmelon, P. 2009. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258(1): 1-19.
- Levins, R. 1968. *Evolution in changing environments*. Princeton University Press, Princeton.
- Liti, G., Barton, D.B.H. & Louis, E.J. 2006. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics* 174(2): 839-850.
- Lopes, P.C., Sucena, E., Santos, M.E. & Magalhães, S. 2008. Rapid experimental evolution of pesticide resistance in *C. elegans* entails no costs and affects the mating system. *PLoS One* 3(11): art. no. e3741.
- Loria, P.M., Hodgkin, J. & Hobert, O. 2004. A Conserved Postsynaptic Transmembrane Protein Affecting Neuromuscular Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience* 24(9): 2191-2201.
- Lottermoser, B.G., Ashley, P.M. & Costelloe, M.T. 2005. Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology* 48(6): 748-761.
- Lozano, J.C., Vera Tomé, F., Gómez Escobar, V. & Blanco Rodríguez, P. 2000. Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. *Applied Radiation and Isotopes* 53(1): 337-343.
- Lynch, M. & Lande, R. 1993. Evolution and extinction in response to environmental change. in: Kareiva, P.M., Kingsolver, J.G. & Huey, R.B. (eds.). *Biotic Interactions and Global Climate Change*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 234-250.
- Lynch, M. & Walsh, B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- MacArthur, R. & Wilson, E.O. 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press, Princeton.
- Mackay, T.F.C. 1981. Genetic variation in varying environments *Genetical Research* 37(1): 79-93.
- Mackay, T.F.C., Fry, J.D., Lyman, R.F. & Nuzhdin, S.V. 1994. Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: Estimates from response to selection of inbred strains. *Genetics* 136(3): 937-951.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J. & Poggiale, J.-C. 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 99(3): 309-319.
- Mathews, T., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., Adam, C. & Della-Vedova, C. 2009. A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science and Technology* 43(17): 6684-6690.
- Maupas, E. 1900. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Arch. Zool. Exp.* 8: 463-624.
- Maynard Smith, J. 1989. *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press, Oxford.
- McCart, C., Buckling, A. & French-Constant, R.H. 2005. DDT resistance in flies carries no cost. *Current Biology* 15(15): R587-R589.
- McCulloch, C.E. & Searle, S.R. 2001. *Generalized, Linear and Mixed Models*. John Wiley & Sons, New York.
- McGrath, S. 2001. How organisms live with heavy metals in the environment. Fact sheet on environmental risk assessment. International Council on Metals and the Environment, Ottawa, Canada.
- McGregor, A.P., Orgogozo, V., Delon, I., Zanet, J., Srinivasan, D.G., Payre, F. & Stern, D.L. 2007. Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene. *Nature* 448(7153): 587-590.

- McGuigan, K. 2006. Studying phenotypic evolution using multivariate quantitative genetics. *Molecular Ecology* 15(4): 883-896.
- Medina, M.H., Correa, J.A. & Barata, C. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67(11): 2105-2114.
- Merilä, J., Sheldon, B.C. & Kruuk, L.E.B. 2001. Explaining stasis: Microevolutionary studies in natural populations. *Genetica* 112-113: 199-222.
- Messiaen, M., Janssen, C.R., Thas, O. & De Schamphelaere, K.A.C. 2012. The potential for adaptation in a natural *Daphnia magna* population: broad and narrow-sense heritability of net reproductive rate under Cd stress at two temperatures. *Ecotoxicology* in press: 1-12
- Miaud, C. & Merilä, J. 2001. Local adaptations or environmental induction? Causes of populations differentiation in alpine amphibians. *Biota* 54: 31-50.
- Millennium Ecosystem Assessment 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L. & Page, N. 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91(1): 246-252.
- Mireji, P.O., Keating, J., Hassanali, A., Mbogo, C.M., Muturi, M.N., Githure, J.I. & Beier, J.C. 2010. Biological cost of tolerance to heavy metals in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology* 24(2): 101-107.
- Misson, J., Henner, P., Morello, M., Floriani, M., Wu, T.-D., Guerin-Kern, J.-L. & Février, L. 2009. Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environmental and experimental botany* 67(2): 353-362.
- Mkandawire, M., Vogel, K., Taubert, B. & Dudel, E.G. 2007. Phosphate regulates uranium(VI) toxicity to *Lemna gibba* L. G3. *Environmental Toxicology* 22(1): 9-16.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. & Hohn, B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442(7106): 1046-1049.

- Morgan, A.J., Kille, P. & Stürzenbaum, S.R. 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science and Technology* 41(4): 1085-1096.
- Morran, L.T., Cappy, B.J., Anderson, J.L. & Phillips, P.C. 2009. Sexual partners for the stressed facultative outcrossing in the self-fertilizing nematode *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* 63(3): 1473-1482.
- Morrissey, M.B., Kruuk, L.E.B. & Wilson, A.J. 2010. The danger of applying the breeder's equation in observational studies of natural populations. *Journal of Evolutionary Biology* 23(11): 2277-2288.
- Mousseau, T.A. & Fox, C.W. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution* 13(10): 403-407.
- Mousseau, T.A. & Roff, D.A. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59(2): 181-197.
- Mousseau, T.A., Uller, T., Wapstra, E. & Badyaev, A.V. 2009. Evolution of maternal effects: Past and present. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1520): 1035-1038.
- Nigon, V. & Dougherty, E.C. 1949. Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* maupas, 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). *The Journal of experimental zoology* 112(3): 485-503.
- Nisbet, R.M., Gurney, W.S.C., Murdoch, W.W. & McCauley, E. 1989. Structured population models: a tool for linking effects at individual and population level. *Biological Journal of the Linnean Society* 37(1-2): 79-99.
- Novak, M., Pfeiffer, T., Lenski, R.E., Sauer, U. & Bonhoeffer, S. 2006. Experimental tests for an evolutionary trade-off between growth rate and yield in *E. coli*. *American Naturalist* 168 (2): 242-251.
- Nowak, C., Vogt, C., Pfenniger, M., Schwenk, K., Oehlmann, J., Streit, B. & Oetken, M. 2009. Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations. *Environmental Pollution* 157(3): 881-886.



- Palumbi, S.R. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293(5536): 1786-1790.
- Pannell, J.R. 2002. The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual review of ecology and systematics* 33: 397-425.
- Parsons, P.A. & Hosgood, S.M.W. 1967. Genetic heterogeneity among the founders of laboratory populations of *Drosophila*. I. *Scutellar chaetae* *Genetica* 38(1): 328-339.
- Phillips, J.W. & Morgan, W.F. 1993. DNA double-strand breaks in mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22(4): 214-217.
- Phillips, P.C. & Arnold, S.J. 1999. Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices. I. Using the flury hierarchy. *Evolution* 53(5): 1506-1515.
- Pigliucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: From phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology and Evolution* 11(4): 168-173.
- Pigliucci, M. 2003. Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters* 6(3): 265-272.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20(9): 481-486.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New-York.
- Posthuma, L. & Van Straalen, N.M. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 106 (1): 11-38
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J. & Preston, C. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46(5): 604-607.
- Prahlad, V., Pilgrim, D. & Goodwin, E.B. 2003. Roles for Mating and Environment in *C. elegans* Sex Determination. *Science* 302(5647): 1046-1049.

- Price, G.R. 1970. Selection and covariance. *Nature* 227(5257): 520-521.
- Price, T. & Schluter, D. 1991. On the low heritability of life-history traits. *Evolution* 45(4): 853-861.
- Price, T.D., Qvarnström, A. & Irwin, D.E. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1523): 1433-1440.
- R Development Core Team 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Ragnarsdottir, K.V. & Charlet, L. 2000. Uranium behaviour in natural environments. in: Cotter-Howells, J.D., Campbell, L.S., Valsami-Jones, E. & Batchelder, M. (eds.). *Environmental mineralogy: Microbial interactions, anthropogenic influences, Contaminated land and waste management* The Mineralogical Society of Great Britain & Ireland, London. 9, pp. 333-377.
- Räsänen, K. & Kruuk, L.E.B. 2007. Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology* 21 (3): 408-421
- Rasband, W.S. 2012. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. & Chevillon, C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: What have we learned about adaptation? *Genetica* 112-113: 287-296.
- Reboud, X. & Bell, G. 1997. Experimental evolution in *Chlamydomonas* III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and time. *Heredity* 78(5): 507-514.
- Reed, D.H. & Frankham, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17(1): 230-237
- Reed, D.H., Lowe, E.H., Briscoe, D.A. & Frankham, R. 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: Effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution* 57(8): 1822-1828.

- Rengasamy, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57(5): 1017-1023.
- Reznick, D., Nunney, L. & Tessier, A. 2000. Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends in Ecology and Evolution* 15(10): 421-425.
- Rieseberg, L.H., Raymond, O., Rosenthal, D.M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J.L., Schwarzbach, A.E., Donovan, L.A. & Lexer, C. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301(5637): 1211-1216.
- Roff, D.A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman and Hall, New York.
- Roff, D.A. 2000. The evolution of the G matrix: Selection or drift? *Heredity* 84(2): 135-142.
- Roff, D.A. 2002a. Comparing G matrices: A MANOVA approach. *Evolution* 56(6): 1286-1291.
- Roff, D.A. 2002b. *Life History Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Roff, D.A. & Fairbairn, D.J. 2007. The evolution of trade-offs: where are we? *Journal of Evolutionary Biology* 20(2): 433-447.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. & Pounds, J.A. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421(6918): 57-60.
- Rose, M.R., Passananti, H.B., Chippindale, A.K., Phelan, J.P., Matos, M., Teotónio, H. & Mueller, L.D. 2005. The effects of evolution are local: Evidence from experimental evolution in *Drosophila*. *Integrative and Comparative Biology* 45(3): 486-491.
- Rundle, H.D. 2003. Divergent environments and population bottlenecks fail to generate premating isolation in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 57(11): 2557-2565.

- Saeki, S., Yamamoto, M. & Iino, Y. 2001. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of experimental biology* 204(10): 1757-1764.
- Salice, C.J., Anderson, T.A. & Roesijadi, G. 2010. Adaptive responses and latent costs of multigeneration cadmium exposure in parasite resistant and susceptible strains of a freshwater snail. *Ecotoxicology* 19(8): 1466-1475.
- Santiago, E. & Caballero, A. 1998. Effective size and polymorphism of linked neutral loci in populations under directional selection. *Genetics* 149(4): 2105-2117.
- Scheiner, S.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual review of ecology and systematics* 24(1): 35-68.
- Schluter, D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* 50(5): 1766-1774.
- Schluter, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, New-York.
- Schluter, D., Clifford, E.A., Nemethy, M. & McKinnon, J.S. 2004. Parallel evolution and inheritance of quantitative traits. *American Naturalist* 163(6): 809-822.
- Schulte, R.D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N.K. & Schulenburg, H. 2010. Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16): 7359-7364.
- Scott, G.R. & Sloman, K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity *Aquatic Toxicology* 68(4): 369-392.
- Sgrò, C.M. & Blows, M.W. 2004. The genetic covariance among clinal environments after adaptation to an environmental gradient in *Drosophila serrata*. *Genetics* 167(3): 1281-1291.
- Sgrò, C.M. & Hoffmann, A.A. 2004. Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* 93(3): 241-248.



- Shen, L., Xiao, J., Ye, H. & Wang, D.-Y. 2009. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environmental toxicology and pharmacology* 28(1): 125-132.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.-O. & Sanipelli, B. 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79(1): 55-83.
- Shirley, M.D.F. & Sibly, R.M. 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53(3): 826-836.
- Sibly, R.M. & Calow, P. 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 37(1-2): 101-116.
- Smith, J.T. & Beresford, N.A. 2005. Chernobyl: catastrophe and consequences. Springer, Chichester.
- Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J. & Lenski, R.E. 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387(6634): 703-705.
- Sochová, I., J., H. & Holoubek, I. 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International* 33(6): 798-804.
- Spiegelhalter, D.J., Thomas, A., Best, N.G. & Lunn, D. 2007. WinBUGS Version 1.4.2 Usermanual. MRC Biostatistics Unit, Cambridge.
- Staniland, L.N. 1957. The swarming of rhabditid eelworms in mushroom houses. *Plant. Pathol.* 6: 61-62.
- Steppan, S.J., Phillips, P.C. & Houle, D. 2002. Comparative quantitative genetics: Evolution of the G matrix. *Trends in Ecology and Evolution* 17(7): 320-327.
- Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: 1-11.
- Stinchcombe, J.R., Rutter, M.T., Burdick, D.S., Tiffin, P., Rausher, M.D. & Mauricio, R. 2002. Testing for environmentally induced bias in phenotypic estimates of natural selection: Theory and practice. *American Naturalist* 160(4): 511-523.



- Sulston, J.E., Albertson, D.G. & Thomson, J.N. 1980. The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures. *Developmental Biology* 78(2): 542-576.
- Sutphin, G.L. & Kaerberlein, M. 2009. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*(27).
- Swain, S.C., Keusekotten, K., Baumeister, R. & Stürzenbaum, S.R. 2004. *C. elegans* metallothioneins: New insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *Journal of Molecular Biology* 341(4): 951-959.
- Tabeaud, M. & Simon, L. 1996. Forests and greenhouse warming | Forêts et réchauffement global. *Bulletin d'Association de Geographes Francais* 73(4): x5-323.
- Teotónio, H., Carvalho, S., Manoel, D., Roque, M. & Chelo, I.M. 2012. Evolution of outcrossing in experimental populations of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS one* 7(4): art. no. e35811.
- Teotónio, H., Manoel, D. & Phillips, P.C. 2006. Genetic Variation for Outcrossing among *Caenorhabditis elegans* isolates. *Evolution* 60(6): 1300-1305.
- Teplitsky, C., Mouawad, N.G., Balbontin, J., De Lope, F. & Møller, A.P. 2011. Quantitative genetics of migration syndromes: A study of two barn swallow populations. *Journal of Evolutionary Biology* 24(9): 2025-2039.
- Thomas, F., Lefèvre, T. & Raymond, M. 2010. *Biologie évolutive*. De Boeck, Bruxelles.
- Thomas, P. & Liber, K. 2001. An estimation of radiation doses to benthic invertebrates from sediments collected near a Canadian uranium mine. *Environment International* 27(4): 341-353.
- Tilman, D. & Lehman, C. 2001. Human-caused environmental change: Impacts on plant diversity and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10): 5433-5440.

- Tominaga, N., Kohra, S., Iguchi, T. & Arizono, K. 2003. A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Science* 49(6): 459-463.
- Travisano, M. & Lenski, R.E. 1996. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics* 143(1): 15-26.
- Tsalik, E.L. & Hobert, O. 2003. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurobiology* 56(2): 178-197.
- Turner, P.E. & Elena, S.F. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156(4): 1465-1470.
- Turner, T.L., Stewart, A.D., Fields, A.T., Rice, W.R. & Tarone, A.M. 2011. Population-based resequencing of experimentally evolved populations reveals the genetic basis of body size variation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics* 7(3): e1001336.
- UNSCEAR 2000. Report. Sources and effects of ionizing radiation, vol I. New-York, United Nations.
- Uralbekov, B.M., Smadis, B. & Burkitbayev, M. 2011. Uranium in natural waters sampled within former uranium mining sites in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 289(3): 805-810.
- Van Doorslaer, W., Stoks, R., Duvivier, C., Bednarska, A. & De Meester, L. 2009. Population dynamics determine genetic adaptation to temperature in daphnia. *Evolution* 63(7): 1867-1878.
- Vandegheuchte, M.B. & Janssen, C.R. 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20(3): 607-624.
- Verwey, P. & Vermeulen, P.D. 2011. Influence of irrigation on the level, salinity and flow of groundwater at vaalharts irrigation scheme. *Water SA* 37(2): 155-164

- Via, S. & Lande, R. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39(3): 505-522.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J.M. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277(5325): 494-499.
- Waddington, C.H. 1957. *The Strategy of the Genes*. George Allen & Unwin, London.
- Wah Chu, K., Chan, S.K.W. & Chow, K.L. 2005. Improvement of heavy metal stress and toxicity assays by coupling a transgenic reporter in a mutant nematode strain. *Aquatic Toxicology* 74(4): 320-332.
- Wah Chu, K. & Chow, K.L. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology* 61(1-2): 53-64.
- Wang, D.-Y., Qiu, X., Wang, H., Qiao, K. & Wang, K. 2010. Reduced fitness associated with spinosad resistance in *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica* 38(2): 103-110.
- Wang, D.-Y. & Wang, Y. 2008a. Nickel sulfate induces numerous defects in *Caenorhabditis elegans* that can also be transferred to progeny. *Environmental Pollution* 151(3): 585-592.
- Wang, D.-Y. & Wang, Y. 2008b. Phenotypic and Behavioral Defects Caused by Barium Exposure in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 54(3): 447-453.
- Wang, D.-Y. & Xing, X. 2008. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences* 20(9): 1132-1137.
- Wang, D.-Y. & Yang, P. 2007. Multi-biological defects caused by lead exposure exhibit transferable properties from exposed parents to their progeny in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences* 19(11): 1367-1372.
- Wang, Y., Xie, W. & Wang, D.-Y. 2007. Transferable properties of multi-biological toxicity caused by cobalt exposure in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(11): 2405-2412.

- Ward, S. & Carrel, J.S. 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 73(2): 304-321.
- Ward, T.J. & Robinson, W.E. 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(9): 2341-2349.
- West-Eberhard, M.J. 2003. Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press, New-York.
- Willi, Y. & Hoffmann, A.A. 2009. Demographic factors and genetic variation influence population persistence under environmental change. *Journal of Evolutionary Biology* 22(1): 124-133.
- Williams, A.E., Rose, M.R. & Bradley, T.J. 2004. The respiratory pattern in *Drosophila melanogaster* selected for desiccation resistance is not associated with the observed evolution of decreased locomotory activity. *Physiological and Biochemical Zoology* 77(1): 10-17.
- Williams, P.L. & Dusenbery, D.B. 1990. Aquatic Toxicity Testing using the Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9(10): 1285-1290.
- Willis, J.H., Coyne, J.A. & Kirkpatrick, M. 1991. Can one predict the evolution of quantitative characters without genetics. *Evolution* 45(2): 441-444.
- Wilson, A.J., Pemberton, J.M., Pilkington, J.G., Clutton-Brock, T.H., Coltman, D.W. & Kruuk, L.E.B. 2007. Quantitative genetics of growth and cryptic evolution of body size in an island population. *Evolutionary Ecology* 21(3): 337-356.
- Wilson, A.J., Pemberton, J.M., Pilkington, J.G., Coltman, D.W., Mifsud, D.V., Clutton-Brock, T.H. & Kruuk, L.E.B. 2006. Environmental coupling of selection and heritability limits evolution. *PLoS Biology* 4(7): 1270-1275.
- Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G. & Hahn, M.E. 2011. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science* 331(6022): 1322-1325.

- Woltereck, R. 1909. Weitere experimentelle Untersuchungen über Artveränderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. Verhandl. d. Deutsch. Zool. Gesellschaft: 110-173.
- Xie, L. & Klerks, P.L. 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. Environmental Toxicology and Chemistry 22(2): 313-320.
- Yasunari, T.J., Stohl, A., Hayano, R.S., Burkhardt, J.F., Eckhardt, S. & Yasunari, T. 2011. Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(49): 19530-19534.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J. & Aliaume, C. 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 86(3): 370-378.